Die Dihydroliponamid-Transacetylase-Komponente des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes aus Escherichia coli. Struktur, Eigenschaften und Verhalten bei der Reassoziation zum Gesamtkomplex

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Mahmud Abusaud
aus
Al-Falojeh / Jordanien

1980

Die Dihydroliponamid-Transacetylase-Komponente des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes aus Escherichia coli. Struktur, Eigenschaften und Verhalten bei der Reassoziation zum Gesamtkomplex

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Mahmud Abusaud
aus
Al-Falojeh / Jordanien

1980

Tag der mündlichen Prüfung:	18. 3. 1980
Dekan:	Prof. Dr. M. Hanack
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. D. Mecke
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. U. Weser

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

SOFORTDRUCK H. G. VOGLER TÜBINGEN

Meinen Eltern gewidmet

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Anleitung von Herrn Professor Dr. D. Mecke am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen durchgeführt.

Herrn Professor Dr. D. Mecke danke ich für die Bereitstellung meines Arbeitsplatzes, ihm und Herrn Dr.H. Bisswanger danke ich herzlich für ihre permanente Beratung. Herrn Frank danke ich für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen, Herrn Karfunkel und Frau Knödler danke ich für ihre Hilfe bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Seite

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	1
2.	MATERIAL UND METHODEN	12
2.1	Material	12
2.1.1	Bakterienstämme	12
2.1.2	Chemikalien	12
2.1.3	Medien	13
2.2	Methoden	14
2.2.1	Genetische Methoden	14
2.2.1.1	Penicillin-Selektion	14
2.2.1.2	Transduktion nach Lennox	15
2.2.2	Biochemische Methoden	17
2.2.2.1	Bakterienzüchtung	17
2.2.2.2	Herstellung des Rohextrakts	17
2.2.2.3	Enzymreinigung	18
2.2.2.4	Enzymtests und Proteinbestimmung	19
2.2.2.5	Proteinbestimmung	20
2.2.2.6	Rohrzuckergradienten-Zentrifugation	20
2.2.2.7	Polyacrylamidgel-Elektrophorese	20
2.2.3	Aufspaltung des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes	21
2.2.3.1	Abspaltung der Pyruvat-Dehydrogenase-Komponente aus dem Komplex	21
2.2.3.2	Abspaltung der Liponamid-Dehydrogenase-Komponente aus dem Komplex	22
2.2.4	Enzymmarkierung mit Fluoreszenzfarbstoffen	23
2.2.5	Proteolytische Teilverdauung	24
2.2.6	Elektronenmikroskopische Aufnahmen	24

		Seite
3.	ERGEBNISSE	25
3.1	Mutagenese	25
3.2	Enzymreinigung	29
3.2.1	Reinigung eines Pyruvat-Dehydrogenase-freien Partial-Komplexes aus einer aceE2-Mutante	29
3.2.2	Abhängigkeit der Aktivität von Äthanolaminpuffer, pH 10 und von 5 M Harnstoff	31
3.2.2.1	Äthanolaminpuffer pH 10	31
3.2.2.2	Stabilität der Aktivität in 5 M Harnstoff	33
3.2.3	Spaltung des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes	34
3.2.3.1	Reinigung der Pyruvat-Dehydrogenase-Komponente	34
3.2.3.2	Reinigung der Transacetylase-Komponente aus dem Partial-Komplex	36
3.2.4	Kinetik der Dihydroliponamid-Transacetylase	37
3.2.4.1	Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Konzentration an Dihydroliponamid	37
3.2.4.2	Abhängigkeit der Transacetylase-Aktivität vom pH-Wert	42
3.2.4.3	Abhängigkeit der Transacetylase-Aktivität von der Temperatur	43
3.3	Rekonstitution des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes	45
3.3.1	Zeitverlauf der Rekonstitution	46
3.3.2	Temperaturabhängigkeit der Verzögerungsphase	49
3.4	Bindung der Pyruvat-Dehydrogenase-Komponente an den Partial-Komplex	51
3.4.1	Bindungsmessung durch Fluoreszenzenergieübertragung	55
3.5	Abstandsmessung	63
3.6	Strukturuntersuchungen der Dihydroliponamid-Transacetylase	69
3.6.1	Rohrzuckergradienten-Zentrifugation	69

		Seite
3.6.2	Proteolytische Teilverdauung	75
3.6.2.1	Einfluß verschiedener Proteasen auf die Gesamtaktivität des Komplexes	75
3.6.2.2	Proteolytische Verdauung eines Partialkomplexes aus Transacetylase und Dihydroliponamid-Dehydrogenase	76
3.6.2.3	Untersuchung der Quartärstruktur und proteolytisch verdautem Komplex	76
4.	DISKUSSION	84
5.	ZUSAMMENFASSUNG	96
6.	LITERATURVERZEICHNIS	99

1. EINLEITUNG

Der Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex aus Escherichia coli ist das größte lösliche Enzymmolekül der Zelle. Er katalysiert folgende Reaktion, die als Gesamtreaktion bezeichnet wird (1, 2, 3):

1. Pyruvat + NAD + CoA ⟶ Acetyl-CoA + CO_2 + NADH + H^+.

Der Komplex besteht aus drei Enzymkomponenten, der Pyruvat-Dehydrogenase (E1) [EC 1.2.4.1], der Dihydroliponamid-Transacetylase (E2) [EC 2.3.1.12] und der Liponamid-Dehydrogenase (E3) [EC 1.6.4.3]. Der Mechanismus der Gesamtreaktion ist in Abb. 1 veranschaulicht.

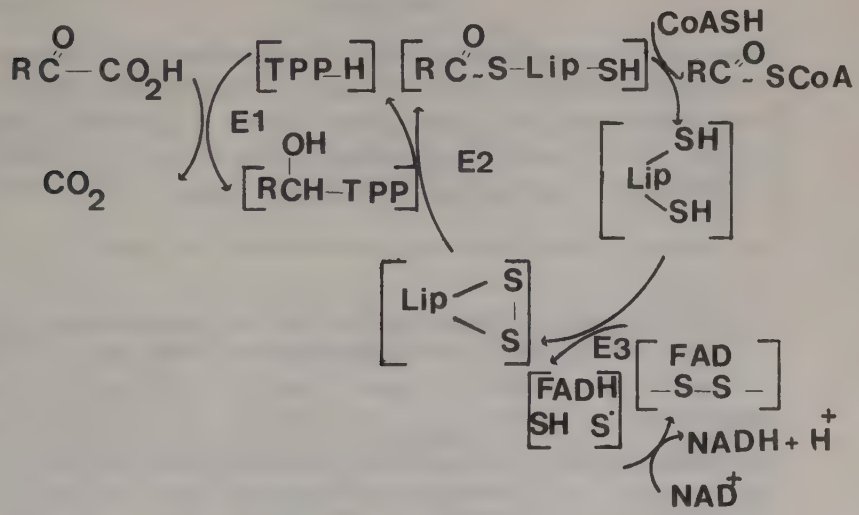

Abb. 1: Reaktionsmechanismus des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes von Escherichia coli (nach Reed und Oliver, (1)). E1: Pyruvat-Dehydrogenase, E2: Dihydroliponamid-Transacetylase, E3: Dihydroliponamid-Dehydrogenase, LipS2: Liponsäure, TPP: Thiamindiphosphat, FAD: Flavin-Adenin-Dinucleotid, R: CH_3-.

Die Gesamtreaktion (1) läuft über mehrere Teilreaktionen ab, in denen die einzelnen Komponenten ihre katalytische Wirkung entfalten (4, 5).

2. Pyruvat + TPP-E1 $\longrightarrow$ CO_2 + Hydroxyäthyl-TPP-E1

3. Hydroxyäthyl-TPP-E1 + Lipoyl-E2 $\longrightarrow$ TPP-E1 + S-Acetyl-dihydrolipoyl-E2

4. S-Acetyl-dihydrolipoyl-E2 + CoA $\longrightarrow$ Acetyl-CoA + Dihydrolipoyl-E2

5. Dihydrolipoyl-E2 + FAD-E3 $\longrightarrow$ Lipoyl-E2 + reduziertes E3-FAD

6. reduziertes E3-FAD+NAD^+ $\longrightarrow$ NADH + H^+ + FAD - E3.

Das Molekulargewicht des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes ist noch umstritten. Dies ist auf die unterschiedlichen Bestimmungsmethoden zurückzuführen. Tab. 1 zeigt eine Übersicht über die Werte, die in der Literatur für das Molekulargewicht des Komplexes angegeben wurden.

Tab. 1: Molekulargewichtsangaben verschiedener Arbeitsgruppen für den Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex

Arbeitsgruppe	Molekulargewicht	Literatur
Koike et al.	4.8×10^6 Dalton	(5)
Vogel et al.	3.8×10^6 Dalton	(6)
Danson et al.	6.1×10^6 Dalton	(7)

Dabei erscheint der von Danson et al. angegebene Wert am zuverlässigsten, da er sich auf eine genaue Bestimmung des Diffusionskoeffizienten über eine neuentwickelte Methode der Laserlichtstreuungsmessung stützt.

Der Komplex setzt sich aus drei verschiedenen Enzymkomponenten zusammen, die ihrerseits wiederum aus mehreren Polypeptidketten bestehen. Die genaue Anzahl der Polypeptidketten im Komplex ist ebenfalls noch umstritten, wie aus der Zusammenstellung in Tab. 2 zu ersehen ist.

Tab. 2: Anzahl der Polypeptidketten der Komplex-Komponenten

Arbeitsgruppe	Stöchiometrie der Komponenten			Literatur
	E1	E2	E3	
Vogel et al.	16	16	16	(6)
Reed et al.	24	24	12	(8, 9)
Perham et al.	48-24	24	24	(10, 11)

Der Enzymkomplex läßt sich unter partiell denaturierenden Bedingungen in die Einzelkomponenten zerlegen, aus denen man wiederum den Komplex in seiner Originalstruktur rekonstruieren kann. Dabei bildet die Transacetylase-Komponente den Kern des Komplexes, an dem die anderen Komponenten unabhängig voneinander nicht-kovalent binden. Die Pyruvat-Dehydrogenase und die Dihydroliponamid-Dehydrogenase können in Abwesenheit der Transacetylase-Komponente miteinander nicht assoziieren (12).

Röntgen-Strukturuntersuchungen der Dihydroliponamid-Transacetylase, wie auch der Dihydroliponamid-Succinylase-Komponente, die ihrerseits den Kern des, dem Pyruvat-

Dehydrogenase-Komplexes in Struktur und Funktion analogen, α - Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplex bildet, haben einen oktaedrischen Aufbau (432) erkennen lassen (13).

Demnach bildet diese Komponente einen Würfel, dessen Ecken durch die Untereinheiten der Pyruvat-Dehydrogenase und dessen Seiten durch die Untereinheiten der Dihydroliponamid-Dehydrogenase besetzt sind (3). Die Pyruvat-Dehydrogenase-Komponente liegt in freier Form als dimeres Protein vor, das aus zwei identischen Polypeptidketten zusammengesetzt ist (3).

Jede Kette hat ein Molekulargewicht von 100 000 Daltons und enthält Thiamindiphosphat (TPP) als Kofaktor, das nicht-kovalent gebunden ist. Die Dihydroliponamid-Dehydrogenase ist ebenfalls in freier Form ein dimeres Proteinmolekül mit einem Molekulargewicht von 56 000 Daltons pro Kette. Als Kofaktor hat jede Kette ein Molekül Flavin-adenin-dinucleotid (FAD) gebunden.

Die Transacetylase, die nicht komplex-gebunden in Form des oben beschriebenen Würfels vorliegt, besteht aus 24 identischen Polypeptidketten mit einem Molekulargewicht von jeweils 83 000 Daltons. Jede Kette besitzt zwei Liponsäurereste, die kovalent an die ε-Aminogruppe eines Lysinrestes gebunden sind (14, 15, 16).

Dieser Lipoyl-Lysyl-Arm (genannt Liponsäurearm) hat eine Länge von 14 Å und übernimmt die Aufgabe der Obertragung der Acetylreste zwischen den drei katalytischen Zentren des Enzymkomplexes. Für die Obertragung der Acetylgruppen wurde von Nawa et al. (14) folgendes Modell vorgeschlagen: Die drei Enzymkomponenten im nativen Komplex sind so angeordnet, daß ihre aktiven Zentren sich in einem Kreis mit einem Durchmesser von 28 Å befinden, der durch den Liponsäurearm überspannt wird.

Dieses Modell wurde durch die Befunde mehrerer Arbeitsgruppen erhärtet (12, 17, 18), jedoch lassen sich die folgenden Ergebnisse damit nicht in Einklang bringen. Mit Hilfe der Methode der strahlungslosen Energieübertragung wurde versucht, die Abstände zwischen den verschiedenen katalytischen Zentren zu bestimmen. Die Arbeitsgruppe von Hammes (19, 20, 21) bestimmte den Abstand zwischen Thiochromdiphosphat, eine dem Kofaktor TPP strukturanaloge Verbindung, und FAD, also zwischen den katalytischen Zentren der E1-und E3-Komponente zu 45 Å.

Ähnliche Messungen zwischen fluoreszierenden SH-Reagenzien, die kovalent an die Dihydroliponsäure gebunden werden und Thiochromdiphosphat einerseits, wie FAD andererseits, ferner zwischen Ätheno-CoA und FAD ergaben in jedem Fall Abstände von 50 Å und darüber (22, 23).

Angesichts dieser Befunde wurde das Modell mit dem einzelnen Liponsäurearm in Frage gestellt. Da alle Ergebnisse der Fluoreszenzenergieübertragung Entfernungen von über 40 Å zwischen den verschiedenen katalytischen Zentren ergaben, ist es unter der Annahme der Richtigkeit dieser Befunde unmöglich, daß ein einziger Liponsäurearm der Länge 14 Å diese Entfernung zwischen den verschiedenen katalytischen Zentren überbrückt und somit die Übertragung des Acetylrests und die Reoxidation am Flavin durchführt. Eine mögliche Erklärung ist die Annahme von zumindest zwei Liponsäuregruppen für die Übertragung der Acetylreste. Dies konnte auch von mehreren Arbeitsgruppen gezeigt werden (17, 24, 25, 26, 27). Der Liponsäuregehalt wurde mit verschiedenen Methoden bestimmt. Shepherd et al. (22) markierte den Komplex mit radioaktiven SH-Reagenzien wie N-Äthylmaleimid und ermittelte den Einbau von 47 Molekülen pro 4.6×10^6 Molekulargewicht.

Collins et al. (28) acetylierte den Komplex mit radioaktiv markiertem Pyruvat, sowie mit markiertem Acetyl-CoA und erhielt 48 Liponsäuregruppen pro Komplexmolekül. Analoge

Versuche am α-Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplex ergaben 24 Liponsäurereste pro Transacetylase.

Ambrose et al. (25) fanden in ihren Experimenten mit der Elektronenspin-Resonanz-Methode mit N-äthylmaleimid-markierter Liponsäure, daß es zwei unterschiedliche Typen von Liponsäureresten im Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex-Molekül gibt, wobei einer stark beweglich und der andere starr ist.

Frey et al. (29) fanden, daß die Hälfte der Liponsäure-gruppen im Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex mit der Dihydroli-ponamid-Dehydrogenase gekoppelt ist, während die andere Hälfte sowohl mit der Dihydroliponamid-Dehydrogenase wie auch mit der Pyruvat-Dehydrogenase gekoppelt ist. Das Zu-sammenwirken dieser Liponsäurereste ist noch nicht ganz geklärt, es wird vermutet, daß die Obertragung zumindest eines Teils der Acetylreste sequentiell verläuft, das heißt, ein Acetylrest wird über mehrere Liponsäuren wei-tergereicht.

Die Biosynthese des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes wird, wie Untersuchungen an Mutanten gezeigt haben, über ein Operon, das ace-Operon gesteuert (30). Es besteht aus zwei benachbarten Strukturgenen, ace E für die Pyruvat-Dehydro-genase-Komponente und ace F für die Transacetylase-Kompo-nente.

Ähnliche Verhältnisse finden sich auch für den α-Ketoglu-tarat-Dehydrogenase-Komplex, bei dem die Strukturgene sucA für die α-Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komponente und sucB für die Transsuccinylase-Komponente zu einem Operon zu-sammengeschlossen sind (31).

Mutationen in den ace-Genen führen zur Abhängigkeit von Acetat, solche in den suc-Genen zur Abhängigkeit von Succinat für das Wachstum der Organismen. Lange Zeit konnten die Gene für die Dihydroliponamid-Dehydrogenase-Komponente

beider Komplexe nicht gefunden werden. Ihre Entdeckung gelang erst 1973 Guest et al. (32, 33).

Diese Mutanten benötigen gleichzeitig Acetat und Succinat für ihr Wachstum. Ihnen fehlte die Dihydroliponamid-Dehydrogenase-Komponente beider Komplexe obwohl die Mutation auf einem einzigen Gen, dem lpd-Gen lokalisiert werden konnte.

Biochemische und immunologische Untersuchungen mit lpd-Mutanten auf der Enzymebene haben bestätigt, daß die Dihydroliponamid-Dehydrogenase in beiden Komplexen identisch ist, eine Komponente die aus einem Komplex gereinigt wurde, konnte mit dem anderen Komplex, dem diese Komponente fehlte, assoziieren und die für den nativen Komplex spezifische Reaktion katalysieren.

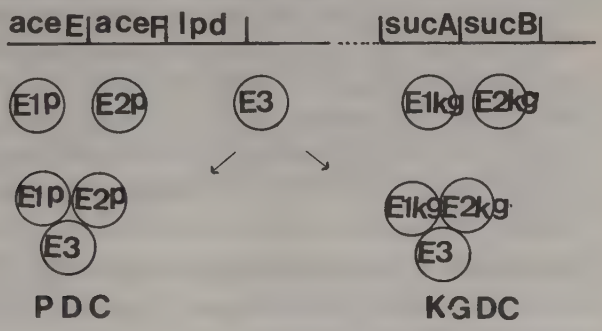

Abb. 2: Gen-Karte des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes (PDC) und des α-Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplexes (nach Guest (33)). E1P: Pyruvat-Dehydrogenase, E2P: Dihydroliponamid-Transacetylase, E1Kg: α-Ketoglutarat-Dehydrogenase, E2Kg: Dihydroliponamid-Transsuccinylase, E3: Dihydroliponamid-Dehydrogenase

Nach diesen Befunden wurden die Gene für beide Komplexe, wie in Abb. 2 gezeigt wird, kartiert (24, 34, 35). Das lpd-Gen grenzt unmittelbar am ace-Operon während das suc-Operon etwas ferner davon liegt. Zwischen beiden Operons liegt ein Bereich, in dem neben lpd-Gene noch andere unbekannte Gene existieren.

Für die Ausführung der Gesamtreaktion (1) wären eigentlich drei Polypeptidketten anstatt der 3 x 24 pro Enzymmolekül ausreichend. Ein Grund für die Größe dieses Enzymkomplexes könnte in der vielfältigen Regulation liegen, dem er unterliegt.

Der Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex nimmt eine zentrale Rolle im Stoffwechsel der Zelle als Verbindungsglied zwischen dem glykolytischen Kohlenhydratabbau und dem Citronensäurezyklus und damit dem Energiestoffwechsel der Zelle ein. Entsprechend greifen verschiedene Metaboliten dieser Stoffwechselwege regulierend in die Aktivität des Enzymkomplexes ein (36, 37). Außerdem weist das Enzym eine kooperative Sättigungskinetik für sein Substrat Pyruvat wie auch für den Kofaktor Thiamindiphosphat auf und unterliegt einer allosterischen Hemmung durch sein Endprodukt Acetyl-CoA.

Das Enzym wird auch durch Guanosintriphosphat gehemmt, aber nicht durch Adenosintriphosphat, Cytidintriphosphat oder Uridintriphosphat (38-42).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle der Transacetylase-Komponente im Hinblick auf die Gesamtreaktion (1), sowie auf die Regulation des Komplexes zu untersuchen, außerdem sollten die proteolytischen Wirkungen sowohl auf die Komplexstruktur, Komplexaktivität wie auch auf die Aktivität der Einzelkomponenten untersucht werden.

Eingehende Untersuchungen der regulatorischen Mechanismen dieses Enzymkomplexes erfordern zunächst eine Aufspaltung dieses Komplexes möglichst in seine aktiven Einzelkomponenten,

so daß deren jeweiliger Einfluß auf das gesamte regulatorische System herausgestellt werden kann. Die herkömmliche Isolierung der Einzelkomponenten aus dem Komplex unter denaturierenden Bedingungen ist insofern dafür nicht geeignet, da die so erhaltenen Teilenzyme wesentliche Aktivitätsverluste erleiden, so daß nicht mehr zu garantieren ist, daß sie die Fähigkeit zur Regulation unbeschadet behalten haben. Deswegen wurde in dieser Arbeit zunächst der Versuch unternommen, die Einzelkomponente direkt aus der Zelle zu isolieren, wobei von Mutanten ausgegangen werden sollte, denen die jeweils anderen Enzymkomponenten fehlen und die daher nur die isolierte Transacetylase synthetisieren.

Mit der gereinigten Enzymkomponente soll dann der Mechanismus der Reassoziation des Gesamtkomplexes studiert werden. Die Kooperativität des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes hinsichtlich der Sättigung mit Pyruvat bzw. Thiamindiphosphat ist verglichen mit anderen kooperativen Enzymsystemen atypisch, da man stark asymmetrische Sättigungsfunktionen erhält, deren kooperativer Bereich unterhalb der Halbsättigung des Enzymes liegt (43). Ein solches Verhalten läßt sich mit Hilfe des Monodschen Modells unter der Annahme der Wechselwirkung einer großen Zahl von Untereinheiten erklären.

Dies würde bedeuten, daß alle 24 Polypeptidketten der Pyruvat-Dehydrogenase-Komponente auf dem Komplex in enger Wechselwirkung zueinander stehen und einen symmetrischen, konzertierten Obergang zwischen zwei unterschiedlichen Konformationen erleiden.

Ein möglicher Weg, einen solchen Mechanismus zu untersuchen, ist die Verfolgung der stufenweisen Rekonstitution des Gesamtkomplexes aus den Teilenzymen. Enge Wechselwirkungen zwischen Untereinheiten, wie sie durch die Modelle kooperativer Systeme gefordert werden, könnten sich dabei in einer Beeinflussung des normalen Bindungsver-

haltens zu erkennen geben. Es wurde hier mit Hilfe zweier unterschiedlicher Methoden versucht, diesen Vorgang sichtbar zu machen, zum einen über den Grad der Reaktivierung, zum anderen wurde mit Hilfe der Methode der strahlungslosen Fluoreszenzenergieübertragung die Ausbildung enger Nachbarschaften verfolgt um so Rückschlüsse auf die Reihenfolge der Besetzung der Bindungsstellen auf dem Komplexmolekül gewinnen zu können. Um diese nicht sehr verbreitete Methode zu charakterisieren, soll an dieser Stelle noch kurz auf deren Prinzip eingegangen werden.

Sind zwei verschiedene fluoreszierende Verbindungen (Chromophore) räumlich sehr eng benachbart (z.B. im Proteinverband), dann besteht zwischen ihnen die Möglichkeit der strahlungslosen Fluoreszenzenergieübertragung. Es ist dazu erforderlich, daß eine weitgehende Oberlappung des Fluoreszenzspektrums der einen Verbindung (Donor) und des Absorptions- bzw. Anregungsspektrums der zweiten Verbindung (Akzeptor) vorliegt. Diese läßt sich ausdrücken durch Oberlappungsintegrale (J). Bei günstiger Orientierung der beiden Chromophore zueinander, durch den Orientierungsfaktor k^2 charakterisiert, findet man dann bei Anregung des Donors eine Ausstrahlung von Fluoreszenzlicht des ursprünglich nicht angeregten Akzeptors. Die Wirksamkeit der Energieübertragung E hängt von der reziproken 6. Potenz des Abstands der Chromophoren (r) zueinander ab:

$$E = \frac{r^{-6}}{r^{-6}+R_o^{-6}}$$

R_o ist die Entfernung der Chromophoren bei 50% Obertragungseffizienz und hat den Wert:

$$R_o = (J \cdot k^2 \cdot Q_o \cdot n^{-4})^{1/6} \times 9.7 \times 10^3 \text{ Å}$$

n ist der Brechungsindex des Mediums zwischen Donor und Akzeptor und Q ist die Quantenausbeute des Donors in Abwesenheit des Akzeptors. Bei Kenntnis aller dieser Größen (k^2 kann bei häufig beobachteter relativ freier Beweglichkeit der beiden Chromophormoleküle als 2/3 angesehen werden) kann aus dem Ausmaß der Energieübertragung (E) der Abstand der Chromophore zueinander berechnet werden. Diese Methode ist in letzter Zeit in verschiedenen Gebieten der Biochemie angewendet worden, so zum Beispiel bei der Strukturaufklärung von Makromolekülen (44), bei der Untersuchung des Bindungsverhaltens von Liganden (45), bei Abstandsbestimmung zwischen bestimmten Zentren oder Bindungsstellen (46), so auch bei der oben beschriebenen Abstandsmessung der drei katalytischen Zentren des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes zueinander, sowie auch in der Immunologie (47).

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Bakterienstämme

Neben dem Wildtyp von Escherichia coli K12 wurden die Mutanten ace E2 (defekt im pdh-Gen), ace F10 (defekt im TA-Gen) verwendet. Beide Mutanten benötigen Acetat zum Wachstum. Diese Stämme wurden von Prof. U. Henning (Max-Planck-Institut, Tübingen) zu Verfügung gestellt. Eine Mutante mit einem Defekt in der Pantothensäurebiosynthese (pan-Mutante) wurde mir von Dr. K. Hantke (Mikrobiologie, Tübingen), die temperatursensitive Mutanten (mit UV-Strahlen stark mutiert) von Prof. Hirota (Tokio) überlassen.

2.1.2 Chemikalien

Calciumphosphat-Gel-Cellulose wurde nach Price et al. (48) präpariert. Penassay (Antibiotic 3), Tryptonbroth, Hefeextrakt und Pepton wurden von der Firma Difco (Detroit Michigan, USA) gekauft, Subtilisin von Firma Merck, Darmstadt. Fluoresceinisothiocynat und Aluminiumoxid sind von der Firma Serva, Heidelberg, Tetramethylrhodamin-5-isothiocynate (Me4RNCS, Isomer R) von der Firma Sigma. Fluorescamin, N-Pyren-maleimid und Dansalaziridin sind von der Firma Fluka (Buchs, Schweiz). CF-11-Cellulose von der Firma Pharmacia (Uppsala, Schweden). Phosphotransacetylase aus Clostridium kluyveri, Lactat-Dehydrogenase aus Schweineherz, Katalase aus Rinderleber, Trypsin aus Rinderpankreas, Thermolysin aus Bacillus thermolyticus, Chymotrypsin, Subtilisin- und CM-Cellulose und Trypsin-Inhibitor aus

Sojabohnen sind von der Firma Boehringer, Mannheim. D,L-Dihydroliponamid wurde aus D,L-Liponamid (Serva) nach der Methode von Reed et al. (49) hergestellt. Alle übrigen Chemikalien wurden von der Firma Merck bezogen.

2.1.3 Medien

Minimalmedien: Minimalmedium nach Vogel und Bonner (VB-Medium) (50), sowie citratfreies Minimalmedium nach Herbert und Guest (51) wurden verwendet. Diese Medien wurden mit 0.5% Glucose als Kohlenstoffquelle versetzt, ferner wurden sie mit 1 µg/ml Vitamin B1 supplementiert.
Vollmedien: Folgende 4 Medien wurde je nach Bedarf eingesetzt:

1) Penassaymedium (Antibiotic 3, 17 g Pro Liter)
2) Tryptonbroth: 13 g Trypton und 7 g Natrionchlorid pro Liter
3) Tryp-Medium: 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt und 5 g Pepton pro Liter destilliertes Wasser
4) Tryp-Glucose: Wie Tryp-Medium, jedoch mit 0.5% Glucose.

Acetat, Succinat wurden gegebenenfalls in einer Endkonzentration von 0.1% zugesetzt, die Aminosäuren zu jeweils 20 µg/ml.
P_1-Platten: Tryp-Glucose wurde mit 1% Difco-Agar und 2.5×10^{-3} M $CaCl_2$ versetzt und in Petri-Schalen von 10 cm Durchmesser gegossen.
P_1-Weichagar: Wie P_1-Platten, jedoch nur mit 0.6%igem Agar.
Minimalplatten: Minimalmedien wurden mit 1.5% Agar versetzt.
Selektionsplatten: Minimalmedien wurden mit den nötigen Zusätzen und 1.5%igem Agar versetzt. Agar, Kohlenstoffquellen und die Zusätze wurden getrennt von der Minimallösung sterilisiert (120 Minuten im Autoklav) und erst

nach dem Abkühlen auf ca. 60° C zusammengemischt.
Hydroxylaminreagenz: 1 M Hydroxylammoniumchlorid, 10^{-3} M EDTA, pH 6.0.
P_1-Mutagenesepuffer: 0.1 M Natriumphosphat, 10^{-3} M EDTA, pH 6.0.
Äthanolaminpuffer: 200 ml 0.04 M Äthanolamin wurden mit 160 ml 0.05 M Kaliumphosphatpuffer (kpp), pH 7.0 gemischt und mit ca. 2 ml 1 M kpp, pH 6.0 auf pH 10 eingestellt, dann auf 400 ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt.
Lösungen für die Polyacrylamidgel-Elektrophorese:
Gelpuffer: 0.22 M Natriumphosphatpuffer, pH 7.0, 0.8% Natriumdodecylsulfat (SDS). Elektrophoresepuffer: Gelpuffer 1:8 verdünnt. Färbelösung: 2.5 g/ml Coomassie-Brilliant Blue, 9.2% Essigsäure, 45% Methanol. Entfärbelösung: 7.5% Essigsäure, 5% Methanol.

2.2 Methoden

2.2.1 Genetische Methoden

2.2.1.1 Penicillin-Selektion

Zwei verschiedene mutagene Substanzen wurden verwendet, Diäthylsulfat und N-Methyl-N-Nitro-N-Nitrosoguanidin. Der zu mutierende Bakterienstamm wurde in 10 ml Penassaymedium über Nacht bei 37° C auf der Schüttelmaschine nachgezüchtet. Danach wurden entweder einige Tropfen Diäthylsulfat oder 100 µg/ml N-Methyl-N-Nitro-N-Nitrosoguanidin zugegeben, leicht geschüttelt und anschließend 20 Minuten im Wasserbad bei 37° C inkubiert. Die Zellen wurden dann vorsichtig von dem am Boden des Gefäßes abgesetzten Mutagen dekantiert und zweimal mit 0.9% Kochsalzlösung gewaschen. Danach wurden die Zellen in citratfreies Glucoseminimal-

medium, das mit Acetat, Succinat, Vitamin B_1, Leucin und Histidin supplementiert war, aufgenommen und über Nacht bei 37° C geschüttelt. Die hochgewachsenen Zellen wurden, wie oben beschrieben, gewaschen und in nicht supplementiertes Minimalmedium auf ca. 10^6 Zellen pro ml verdünnt. Pro ml wurden dann 400 Einheiten Penicillin zugegeben und die Zellsuspension 6 Stunden bei 37° C im Wasserbad geschüttelt. Danach wurden die Zellen auf supplementierte Platten so ausplattiert, so daß ca. 100-150 Kolonien pro Platte wachsen, und die Platten bei 37° C inkubiert.

Nach 2-3 Tagen wurden die Kolonien mit einem Lederberg-Stempel auf Selektionsplatten überstempelt. Selektionsplatten unterscheiden sich von den supplementierten Platten dadurch, daß ihnen die Substanzen fehlen, die für die gesuchten Mutanten lebenswichtig sind, so daß diese auf den Selektionsplatten keine Kolonien bilden. Nach eintägiger Inkubation der Selektionsplatten bei 37° C können daher die Mutanten durch Vergleich mit den ursprünglichen supplementierten Platten (Stammplatten) erkannt werden. Die Kolonien, die nur auf supplementierten Platten gewachsen sind, wurden mit einem sterilen Zahnstocher herausgenommen, in Minimalcitratlösung suspendiert und durch Ausstreichen auf Selektionsplatten und auf supplementierten Platten nochmals auf ihre Mutation überprüft.

2.2.1.2 Transduktion nach Lennox (52)

Herstellung des P_1-Lysates: 0.3 ml einer Bakterienkultur (Donorstamm) die ca. 10^9 Zellen pro ml enthält, wurden mit ca. 5 x 10^6 Phagen (Virulente Phagen P_1) in 2.5 ml Weichagar, der auf 45° C gehalten wurde, gemischt und sofort auf frische P_1-Platten gegossen und solange bei 37° C inkubiert, bis sich eine "konfluente Lyse" bildet, das heißt bis die

Plaques zusammengewachsen sind. Danach wurde der Weichagar mit einem sterilen Spatel abgekratzt, in einem Reagenzglas mit 2-5 ml Chloroform vermischt und verrieben. Das Gemisch wurde abzentrifugiert (5000 upm) und der Oberstand über Chloroform aufgehoben.

Gehaltsbestimmung der P_1-Lysate: Vom P_1-Lysat wurde eine Verdünnungsreihe in Minimallösung hergestellt, dann wurde von jeder Verdünnung 0.1 ml mit 0.2 ml Bakteriensuspension (Indikatorstamm) in 2.5 ml Weichagar vermischt und auf P_1-Platten gegossen. Nach dem Wachsen wurden die Plaques gezählt und unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors die Anzahl der Phagen pro ml bestimmt.

Gen-Transduktion: Wie oben beschrieben wird ein P_1-Lysat eines Bakterienstammes (Donor), der das zu transduzierende Gen enthält, hergestellt. 2 ml einer über Nacht hochgewachsenen Bakterienkultur (Akzeptorstamm), dem das Gen fehlt, wurden in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert und in 1 ml Tryp-Medium suspendiert, das 2.5×10^{-3} M $CaCl_2$ enthielt. Es wurden ca. 10^9 Phagen zugegeben und das Gemisch 25 Minuten bei 37^o C inkubiert. Dann wurden 9 ml VB-Medium hinzugegeben und die Bakterien abzentrifugiert, zweimal gewaschen und anschließend in 2 ml VB-Medium aufgenommen. Es wurden davon 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} ml auf selektive- und supplementierte Platten ausgestrichen.

Spezielle Transduktion: Bei dieser Methode wurden anstatt des Bakteriums die transduzierenden Phagen mutiert.
4 Teile der Hydroxylaminlösung wurden mit 6 Teilen des Natriumphosphatpuffers und 1 Teil P_1-Lysat gemischt, mit 0.5 ml Chloroform versetzt und 1-3 Tage unter Lichtausschluß bei 37^o C inkubiert. Nach der Inkubation wurde ein ml des obigen Ansatzes mit einem ml Tryptonbroth und 2×10^9 Bakterien versetzt, die Mischung enthält 5×10^{-3} M $CaCl_2$. Es wurde 15 Minuten bei 37^o C inkubiert, dann abzentrifugiert, gewaschen, in VB-Medium aufgenommen und anschließend 10^{-1} - 10^{-5} auf Selektions- und supplementierten Platten ausgestrichen. Nach dem Wachstum wurden die gesuchten Mutanten isoliert und überprüft.

2.2.2 Biochemische Methoden

2.2.2.1 Bakterienzüchtung

Der Wildtypstamm wurde auf 0.4% Pyruvat, Acetat-Mutanten auf 0.4% Pyruvat, 0.1% Acetat und 1 µg/ml B_1 gezüchtet. Die temperatursensitiven Mutanten wurden in Penassay-Medium bei 29° C gezüchtet. Zur Anzucht der Subkultur wurden 10 ml des betreffenden Mediums mit den Zellen angeimpft und bei der entsprechenden Temperatur inkubiert. Nach dem Wachstum wurden die Subkulturen zur Animpfung der Vorkulturen (1 Liter) und diese ihrerseits zum Animpfen der Hauptkulturen angewandt.

2.2.2.2 Herstellung des Rohextrakts

Für die Vorversuche wurden schon die Vorkulturen zur Gewinnung des Rohextrakts verwendet, ansonsten wurden die Hauptkulturen (20 oder 200 Liter) genommen. Nach dem Wachsen der Zellen bis zu einer optischen Dichte von 1.5 wurden sie in einer Durchlaufzentrifuge abzentrifugiert, mit der 2-3-fachen Menge ihrer Gewichtsmenge mit Aluminiumoxid vermischt und in einer Mörsermühle in der Kälte aufgeschlossen. Das Gemisch wurde mit 15 ml 0.1 M Kaliumphosphatpuffer (kpp), pH 7.0 versetzt und nochmals 10 Minuten aufgeschlossen. Das Gemisch wurde 10 Minuten bei 10 000 g und 4° C abzentrifugiert, der Niederschlag mit 10 ml des gleichen Puffers verrieben und nochmals wie vorher abzentrifugiert. Beide Oberstände wurden vereinigt und werden im nachfolgenden als "Rohextrakte" bezeichnet.

2.2.2.3 Enzymreinigung

Für die Reinigung des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes wurde ein 50 mM kpp, pH 7.5 verwendet (1 mM EDTA, 0.2 mM DTE). Der Rohextrakt wurde 15 Minuten bei 20 000 g in einer Kühlzentrifuge abzentrifugiert, dann der Oberstand auf einen Proteingehalt von 15 mg/ml mit kpp verdünnt und 4 Stunden bei 170 000 g in der Ultrazentrifuge (Spinco-L-65 von Beckman Instruments, Palo Alto, California) abzentrifugiert. Das Enzym geht bei Stehen über Nacht bei 4^{o} C in Lösung. Durch zwanzig minütige Zentrifugation bei 20 000 g wurden unlösliche Bestandteile abgetrennt und der Oberstand wie vorher in der Ultrazentrifuge abzentrifugiert. Der Zentrifugationsvorgang wurde insgesamt dreimal wiederholt. Der Niederschlag der dritten Ultrazentrifugation wurde in einer geringen Menge des gleichen Puffers, jedoch ohne Zusatz von EDTA gelöst und auf eine Ca-Phosphat-Cellulose-Säule (Ø = 2.5 cm/Höhe 4 cm), die mit dem gleichen Puffer (ohne EDTA) äquilibriert war, aufgetragen. Anschließend wurde die Säule mit demselben Puffer (ohne EDTA) gewaschen bis das Eluat keine Absorption bei 280 nm mehr zeigte. Das Enzym wurde mit einem 200 ml-Gradienten von 50-500 mM kpp eluiert und Proteinkonzentration und Enzymaktivität in den einzelnen Fraktionen gemessen. Die aktivsten Fraktionen wurden vereinigt und in der Ultrazentrifuge, wie vorher beschrieben, konzentriert. Danach wurde der nunmehr intensiv gelbe Niederschlag in wenig kpp mit EDTA und DTE gelöst und aufgehoben. Auf dieser Stufe ist das Enzym normalerweise elektrophoretisch rein, in manchen Fällen erweist es sich aber als nötig, den säulenchromatographischen Schritt zu wiederholen.

2.2.2.4 Enzymtests und Proteinbestimmung

Dismutationstest: Dieser Test wurde nach der Methode von Reed et al. (49) für die Bestimmung der spezifischen Aktivität des Komplexes verwendet.

NAD-Test nach Schwartz et al. (53): Als Meßgröße wurde die Absorptionszunahme des gebildeten NADH in der Gesamtreaktion (1) bei 340 nm und 37° C verfolgt. In einer ml Testlösung in 50 mM kpp, pH 7.5 sind folgende Zusätze enthalten: 2.5 mM NAD, 4 mM Pyruvat, 0.2 mM TPP, 0.1 mM CoA, 1 mM $MgCl_2$ und 2.4 mM neutrales Cystein (mit KOH).

Transacetylase-Test nach Schwartz et al. (54): Als Meßgröße wurde hier die Zunahme der Absorption des gebildeten S-Acetyl-Liponsäureamids bei 240 nm und 37° C verfolgt. Diese Reaktion ist unphysiologisch.

$$\text{Acetyl-Phosphat} + \text{CoA} \xrightarrow{PT} \text{Acetyl-CoA} + P_i$$

$$\text{Acetyl-CoA} + \text{Dihydroliponsäureamid} \xrightarrow{E_2} \text{CoA} + \text{S-Acetyl-Dihydroliponsäureamid.}$$

1 ml 0.1 M kpp, pH 7.5 enthält: 10 mM Acetyl-phosphat, 4 mM Dihydroliponsäureamid, 0.1 mM CoA und 10 Enzymeinheiten Phosphotransacetylase (PT).

Diphydroliponsäureamid-Dehydrogenase-Test nach Hager et al. (55): Die Absorptionszunahme des bei 37° C gebildeten NADH bei 340 nm wurde als Meßgröße der Reaktion betrachtet.

$$\text{Dihydroliponsäureamid} + E_3\text{-FAD} \longrightarrow \text{Liponsäureamid} + \text{reduziertes } E_3\text{-FAD}$$

$$\text{reduziertes } E_3\text{-FAD} + NAD^+ \longrightarrow E_3\text{-FAD} + NADH + H^+.$$

1 ml 0.1 M kpp, pH 7.5 enthält 2 mM NAD, 4 mM Dihydroliponsäureamid und 0.4 mM DTE.

Pyruvat-Dehydrogenase-Test: Hier wurde die Absorptionsabnahme bei 436 nm nach der Methode von Bergmeyer (56) als Meßgröße der Reaktion verfolgt.

Katalase-Test: Die Absorptionsabnahme von H_2O_2 bei 240 nm wurde als Meßgröße der Reaktion betrachtet (57).

2.2.2.5 Proteinbestimmung

Das Protein wurde während der Reinigung nach der Biuret-Methode (58), bei gereinigten Enzymen nach der Methode von Warburg und Christian (59) aus dem Verhältnis der Absorptionen bei 280 und 260 nm bestimmt.

2.2.2.6 Rohrzuckergradienten-Zentrifugation

Die Rohrzuckergradientenzentrifugation wurde nach der Methode von Martin et al. (57) durchgeführt. Die linearen Gradienten wurden in 0.1 M kpp, pH 7.0 von 10-30% Rohrzucker bei einem Gesamtvolumen von 5 ml mit Katalase als Vergleichsenzym angesetzt. Sie wurden 3.5 Stunden bei 150 000 g in einem SW 65-Ti-Rotor zentrifugiert.

2.2.2.7 Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Für die Polyacrylamidgel-Elektrophorese in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat (SDS) nach der Methode von Weber und Osborn (60) wurden 10%ige Gele in 10 cm langen Glasröhrchen von 0.5 cm Durchmesser gegossen. Die Elektrophorese wurde bei Raumtemperatur und 8 mA pro Gel durchgeführt. Danach wurden die Gele in Coomassie Brilliant Blue eine Stunde gefärbt und anschließend im Wasserbad bei 50^{o} C 24 Stunden entfärbt.

2.2.3 Aufspaltung des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes nach der Methode von Koike et al. (12)

2.2.3.1 Abspaltung der Pyruvat-Dehydrogenase-Komponente aus dem Komplex

Eine Calciumphosphat-Cellulose-Säule wurde solange mit Äthanolaminpuffer pH 10 (siehe Material) gewaschen, bis das Eluat den gleichen pH-Wert des Puffers hatte. Anschließend wurde der Enzymkomplex aufgetragen und die Säule mit dem Äthanolaminpuffer solange nachgewaschen bis die abgespaltene Pyruvat-Dehydrogenase-Komponente eluiert war und das Eluat keine Absorption bei 280 nm mehr zeigte. Die Säule wurde dann mit 0.4 mM kpp, pH 7.5 gewaschen um den, von der Pyruvat-Dehydrogenase (pdh) befreiten, Komplex, der als gelbe Bande wandert, zu eluieren. Beide enzymhaltigen Eluate wurden so schnell wie möglich gegen 50 mM kpp, pH 7.0 im Kühlraum dialysiert. Danach wurden sie 5 Stunden bei 170 000 g abzentrifugiert, dabei bildet der pdh-freie Komplex (Restkomplex) einen gelben Niederschlag, während die Pyruvat-Dehydrogenase-Komponente im Oberstand bleibt. Somit erzielte der Ultrazentrifugationsschritt einerseits die Konzentration des Restkomplexes und andererseits die Trennung der Pyruvat-Dehydrogenase-Komponente von den evtl. mitgewaschenen Komplexspuren (während der Abspaltung). Der Oberstand von der abgespaltenen Pyruvat-Dehydrogenase-Komponente, der nun nur diese Komponente in freier Form enthält und im nachfolgendem als E1-Komponente bezeichnet wird, wurde mit Hilfe von Eintauchmolekularfilter (Millipore Bedford, Mass. USA) konzentriert. Der Restkomplex wurde in wenig 50 mM kpp, pH 7.0 aufgenommen und für die weitere Verwendung aufgehoben. Er besteht nur aus zwei Komponenten: Die Dihydroliponamid-Dehydrogenase-Komponente und die Dihydroliponamid-Transacetylase-Komponente.

2.2.3.2 Abspaltung der Liponamid-Dehydrogenase-Komponente aus dem Restkomplex

Eine Calciumphosphat-Cellulose-Säule wurde mit 50 mM kpp, pH 7.5 äquilibriert und der pdh-freie Enzymkomplex (RK) aufgetragen. Dieser muß als eine scharfe Zone auf der Säule adsorbiert werden, um eine gute Trennung mit möglichst wenig Harnstofflösung zu erreichen. Nach der Adsorption wurde die Säule mit 30 mM kpp-Lösung pH 7.5, die 5 M Harnstoff und 1% Ammoniumsulfat enthält, gewaschen. Das proteinhaltige Eluat, das die abgespaltene Dihydroliponamid-Transacetylase-Komponente enthält, wurde sofort mit Wasser auf die Hälfte verdünnt, um die Harnstoffmolarität auf etwa 2.5 M zu verdünnen. Diese Molarität wirkt wenig inaktivierend auf die abgespaltene Enzymkomponente. Das verdünnte Eluat (enzymhaltig) wurde auf eine zweite Calciumphosphatsäule, die wie die erste Säule vorbehandelt wurde, aufgetragen. Die Transacetylase-Komponente bindet an der Säule und wird dadurch vom Harnstoff befreit. Sie wird anschließend mit 0.3 M kpp, pH 7.5 eluiert.

Die Dihydroliponamid-Dehydrogenase-Komponente, die als gelbe Bande auf der ersten Säule geblieben war, wird mit 0.3 M kpp, pH 7.5 eluiert. Beide Enzymkomponenten wurden gegen 50 mM kpp, pH 7.0 im Kühlraum dialysiert und danach 6 Stunden bei 170 000 g in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Dabei bildet die Transacetylase-Komponente einen farblosen Niederschlag, während die Dihydroliponamid-Dehydrogenase-Komponente im gelben Oberstand bleibt. Die Transacetylase wurde in wenig 50 mM kpp, pH 7.5 durch Stehen im Kühlraum gelöst.

2.2.4 Enzymmarkierung mit Fluoreszenzfarbstoffen

Zur Messung der Fluoreszenzenergieübertragung wurden die Proteinproben nach zwei verschiedenen Methoden markiert. Nach der Methode von Ulman et al. (47) wurde der Fluoreszenzfarbstoff in Aceton gelöst, dann wurde die 100-200-fache Menge (bezogen auf die Molarität) des Farbstoffes mit dem zu markierenden Protein in 0.1 M kpp, pH 7.5 6 Stunden bei 4^{o}C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Mischung abzentrifugiert, um das durch das Aceton inaktivierte ausgefallene Enzym abzutrennen.

Der Oberstand, der das markierte Enzym und evtl. noch freien Farbstoff enthält, wurde auf eine Sephadex-G25-Säule (30 cm lang und 2.5 cm Durchmesser) aufgetragen und mit dem gleichen Puffer eluiert. Dabei wandert das markierte Enzym viel schneller als der freie Farbstoff. Die Reinigung des markierten Enzyms vom freien Farbstoff wurde auch durch intensive Dialyse der Mischung gegen den gleichen Puffer (61, 62, 63) durchgeführt. Der Puffer wurde mehrmals gewechselt.

Die zweite Markierungsmethode wurde nach Scouten (64) durchgeführt. Die Fluoreszenzfarbstoffe wurden in 5 ml Aceton oder Äthanol gelöst, dann 1 g Whatman FC 11-Cellulose dazugegeben und solange gerührt, bis die Cellulose gut benetzt war. Anschließend wurde die Mischung im Vakuum gut getrocknet. Die Markierung der Enzymproben erfolgte dadurch, daß man eine bestimmte Menge dieses Pulvers in dem gleichen kpp suspendiert und dazu eine bestimmte Menge des zu markierenden Enzyms dazugibt (im gleichen Verhältnis wie voher) und die Mischung, wie vorher beschrieben, behandelt.

2.2.5 Proteolytische Teilverdauung

Für das Studium der proteolytischen Verdauung mit exogenen Proteasen wurden die Enzymproben mit den verschiedenen Proteasen wie folgt behandelt.

a) Thermolysin: 1 mg Enzym wurde mit 10 µg Protease in 1 ml 0.1 M kpp-Lösung, pH 7.5, die 2 mM $CaCl_2$ und 10 mM Boratpuffer enthält, bei 4° C 40 Minuten inkubiert. Die Reaktion wurde mit 10 mM EDTA (Endkonzentration) gestoppt.
b) Trypsin: 1 mg Enzym wurde mit 10 µg Protease in 1 ml 0.1 M kpp, pH 7.5 bei 4° C 40 Minuten inkubiert und nach Beendigung der Reaktion mit 20 µg Trypsin-Inhibitor gestoppt. (1 mg Inhibitor hemmt 1.4 mg Trypsin).
c) Subtilisin-CM-Cellulose: 1 mg Enzym wurde mit 40 µg gequollener Subtilisin-CM-Cellulose 40 Minuten in 0.1 M kpp, pH 7.5 bei 4° C inkubiert und die Lösung anschließend abzentrifugiert.
d) Chymotrypsin: 1 mg Enzym wurde mit 10 µg Protease in 1 ml 0.1 M kpp, pH 7.5 bei 4° C 40 Minuten inkubiert.

2.2.6 Elektronenmikroskopische Aufnahmen

Enzympräparate wurden mit Phospho-Wolframsäure behandelt und mit Wasser gewaschen. Aufnahmen wurden im Siemens Elmiskop 2 A durchgeführt. (Mikroskopische Präparate wurden von Herrn Hermann Frank, Max-Planck-Institut für Virusforschung, Tübingen, durchgeführt).

3. ERGEBNISSE

3.1 Mutagenese

Für die Reinigung der Enzymkomponenten des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes kann man zwei verschiedene Wege einschlagen. Nach der Methode von Koike et al. (12) spaltet man den gereinigten Enzymkomplex schrittweise in seine Untereinheiten (Komponenten). Diese Methode vermindert aber die Aktivität der Einzelkomponenten und könnte auch deren Fähigkeit, den Komplex in seiner Originalstruktur zu rekonstituieren, beeinträchtigen. Dieses Problem ließe sich umgehen, wenn es gelänge, die Einzelkomponenten des Enzymkomplexes aus Mutanten zu reinigen.

Eine lpd-Mutante, die einen dihydroliponamid-dehydrogenasefreien Komplex synthetisiert, wäre eine geeignete Mutante, weil man aus ihr einen Partialkomplex (E1E2) isolieren könnte, aus dem man einerseits beide Komponenten, die Pyruvat-Dehydrogenase und die Dihydroliponamid-Transacetylase leicht mit Äthanolaminpuffer spalten könnte und somit in einem Spaltungsschritt zwei saubere Enzyme erhielte. Andererseits könnte man diesen Restkomplex (E1E2) für das Studium des Bindungsverhaltens der Dihydroliponamid-Dehydrogenase, die ihrerseits aus geeigneten Zellen gereinigt werden kann (Manuskript in Vorbereitung), an den Komplex verwenden.

Ferner ließe sich die Transacetylase-Komponente direkt in isolierter Form gewinnen, wenn es gelänge, in eine lpd-Mutante zusätzlich eine Mutation des Genes für die pdh-Komponente einzuführen.

Während in der aceE2-Mutation bereits ein geeigneter Stamm zur Verfügung stand, der nicht mehr in der Lage ist, die Pyruvat-Dehydrogenase (pdh) zu synthetisieren, erwiesen sich die von Guest (32) gewonnenen lpd-Mutanten als instabil, da sie rasch zum Wildtypcharakter revertieren.

Damit ist diese Mutante für die Gewinnung größerer Enzymmengen ungeeignet.

Es stellte sich damit zunächst die Aufgabe, eine stabile lpd-Mutante zu isolieren, in die dann die E2-Mutation transduziert werden sollte. Durch die Kenntnis der Lage des lpd-Gens direkt im Anschluß an das ace-Operon schien es aussichtsreich, eine geeignete Mutation in dieser Region einzuführen. Mutationen in diesem Gen (lpd) müßten sich durch das gleichzeitige Auftreten eines Wachstumsbedürfnisses von Acetat und Succinat zu erkennen geben, während Mutanten des ace-Operons nur Acetat benötigen.

Nach Mutagenese mit Diäthylsulfat und Penicillinselektion fanden sich zunächst nur einfache acetatabhängige Mutanten, wovon die Mehrzahl (6 von insgesamt 8) im aceE-Gen, der Rest im aceF-Gen defekt war.

In einem zweiten Verfahren wurde versucht, gezielte Deletionen einzuführen. Aufgrund der detaillierten Genkarte, die von Escherichia coli aufgestellt wurde (Abb. 2), ist zu schließen, daß das lpd-Gen nicht weit entfernt von dem rechts davon liegenden pan-Gen (für die Synthese der Pantothensäure) (33) ist. Eine Deletion in diesem Bereich könnte beide Gene (lpd- und pan-Gen) erfassen. Daher wurden durch Mutagenese mit Methylnitroguanidin Deletionsmutationen induziert und in Gegenwart von Acetat und Succinat im Medium auf pan-Mutanten selektioniert.

Diese sollten bei der engen Nachbarschaft der Gene mit gewisser Wahrscheinlichkeit auch bis in das lpd-Gen reichen. Der Stamm sollte dann zusätzlich von Acetat und Succinat abhängig werden. Solche Doppelmutanten konnten jedoch in keinem Fall gefunden werden. Es fanden sich auch keine Stämme, die nur das Pantothensäure- und das Acetatbedürfnis erhalten hätten. Der negative Ausgang dieser Experimente mag darauf zurückzuführen sein, daß zwischen dem pan- und dem lpd-Gen ein unbekannt gebliebenes essentielles

Gen liegt, für dessen Bedürfnis nicht supplementiert werden konnte.

Schließlich wurde mit Hilfe der speziellen Transduktion (siehe Methoden-Teil) versucht, ein kurzes DNA-Stück in der Umgebung des pan- und damit auch des lpd-Gens in einen anderen Stamm mit Hilfe des P_1-Phagen zu transduzieren (65-71) und während dessen den P_1-Phagen mit dem DNA-Fragment des Bakterienstammes (Donor) zu mutieren. Dies erlaubt eine sehr viel intensivere Einwirkung des mutagenen Reagenzes, so daß die Wahrscheinlichkeit, daß das transduzierte Genstück mehrere Mutationen erlitten hat, außerordentlich erhöht wird.

Wie in Abb. 3 skizziert, wurde dabei so vorgegangen, daß das zu transduzierende Genstück vom Wildtyp (Ymel) in einen Stamm eingebaut wurde, der Mutationen sowohl im leu- wie auch im pan-Lokus, also unmittelbar rechts und links der ace-Region und des lpd-Gens enthielt.

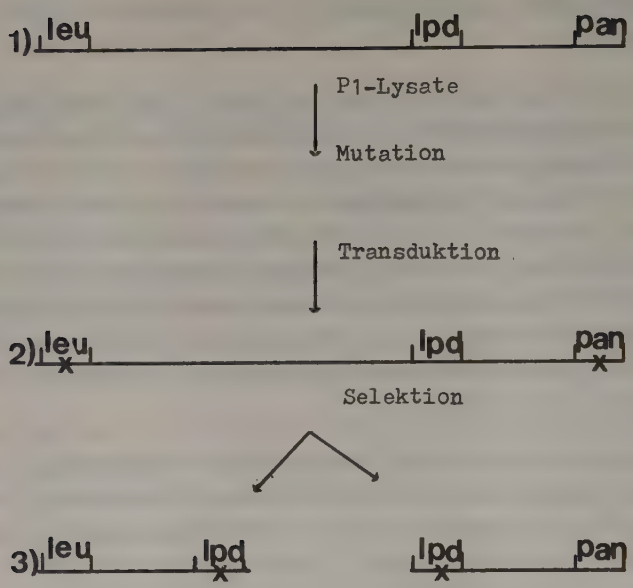

Abb. 3: Darstellung der speziellen Transduktionsmethode mit den P_1-Phagen. Transduziert werden sollten die Gene Leucin (leu) und/oder Pantothen (pan) aus dem Wildtyp (Donor), (1) in einen Rezeptorstamm (2), der defekt in einem oder beiden der genannten Gene ist. Die gewünschten Mutanten sind unter den Transduzenten (3) zu suchen.

Die erfolgreiche Transduktion ließe sich dann in einem Fall an dem Verlust des Leucin- im anderen an dem des Pantothensäure-Bedürfnisses erkennen. Während der speziellen Transduktion induzierte Mutationen andererseits zeigen sich am Auftreten neuer Bedürfnisse. Es ließen sich auf diese Weise zwar die bekannten ace-Mutanten, jedoch keine lpd-Mutation erhalten.

Ein letzter Weg war die Untersuchung einer größeren Zahl (über 100) temperatursensitiver Mutanten, die von Hirota gewonnen waren. Diese waren alle einer außerordentlich starken Mutagenese unterworfen, so daß jeder Stamm zumindest 5 Mutationen trägt, und daß damit in einer bestimmten Anzahl dieser Mutanten jedes Gen betroffen sein sollte. Auch hier erwies sich die Suche nach stabilen lpd-Mutanten als erfolglos.

Der negative Ausgang dieser Experimente mag darauf zurückzuführen sein, daß der genetische Hintergrund der Dihydroliponamid-Dehydrogenase etwas komplizierter ist, als aufgrund der vorliegenden Untersuchungen angenommen werden kann. Dies würde eine genauere genetische Analyse erfordern, die den gestellten Rahmen dieser Arbeit übersteigt. Es wurde daher im weiteren versucht, die Transacetylase-Komponente nach der Methode von Koike et al. (12) durch Spaltung des Komplexes zu isolieren. Ferner konnte aus der Mutante aceE2 ein Partialkomplex isoliert werden, dem die Pyruvat-Dehydrogenase-Komponente fehlt.

3.2 Enzymreinigung

3.2.1 Reinigung eines Pyruvat-Dehydrogenase-freien Partial-Komplexes aus einer aceE2-Mutante

Es wurde der Versuch unternommen, die Transacetylase-Komponente aus einer der isolierten aceE2-Mutanten zu isolieren. Zunächst mußte der Partialkomplex gereinigt werden, um ihn dann, wie in den Methoden beschrieben, in die Einzelkomponenten zu spalten. Die Zellen wurden, wie in den Methoden beschrieben, auf Pyruvat und Acetat gezüchtet und aufgeschlossen.

Der so gewonnene Rohextrakt besaß keine Gesamtaktivität für den Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex, jedoch noch Transacetylase- und Dihydroliponamid-Dehydrogenase-Aktivität. Die Gesamtaktivität ließ sich durch Zugabe einer Probe der Pyruvat-Dehydrogenase-Komponente aus aceF10 Mutante oder aus dem nativen Komplex des Wildtyps rekonstruieren. Der Reinigungsverlauf entspricht grundsätzlich dem für den nativen Komplex, wobei die obengenannten Teilaktivitäten oder die rekonstituierte Gesamtaktivität als Maß für die Anreicherung herangezogen werden können.

Tab. 3: Reinigungstabelle des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes aus dem Wildtyp (B) und des Partialkomplexes aus der isolierten aceE2-Mutante (A), SA (spezifische Aktivität). Hier wurde die rekonstituierte Gesamtaktivität (mit Oberschuß an zugegebene Pyruvat-Dehydrogenase) für die Mutante bzw. Gesamtaktivität für den Wildtyp im NAD-Test bei 37° C gemessen, EE: Enzymeinheiten, UZ: Ultrazentrifugationsschritt

Reinigungsschritt	Gesamtprotein (mg)	Gesamtaktivität (EE)	Spezifische Aktivität (EE/mg)	Reinigungsfaktor
A) aceE2 (200 l - Ansatz)				
Rohextrakt	5679	341700	60	-
1. UZ	1804	154500	85	1.4
2. UZ	735	110340	150	2.5
3. UZ	146	1440	10	0.2
B) Wildtyp (40 l - Ansatz)				
Rohextrakt	741	240820	325	-
1. UZ	342	201780	590	1.8
2. UZ	228	174500	765	2.4
3. UZ	104	150650	1448	4.5
Calciumphosphat-Säule	36	133950	3720	11.4

Bei der Reinigung des Partialkomplexes aus der Mutante hat sich herausgestellt, daß diese Mutante nicht geeignet ist, um aus ihr nach der Methode von Koike et al. (12) die Transacetylase-Komponente zu isolieren, weil der so gereinigte Partialkomplex extrem instabil ist, so daß die Ausbeute an Aktivität schon nach dem dritten Zentrifugationslauf weniger als 1% beträgt. Aus diesem Grund wurde auf jede weitere Enzymreinigung aus der Mutante verzichtet. Dafür wurde der Wildtyp herausgezogen, um aus ihm den nativen Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex zu reinigen und in seine Einzelkomponenten zu spalten. Die Ausbeute am aktiven Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex aus dem Wildtyp war ausreichend, um die Komponenten aus dem Komplex isolieren zu können.

3.2.2 Abhängigkeit der Aktivität von Äthanolaminpuffer, pH 10 und von 5 M Harnstoff

Bevor mit der Komplexspaltung angefangen wurde, wurde die Wirkung sowohl des Puffers wie auch des Harnstoffes auf die Aktivität des nativen Komplexes und seinen Untereinheiten untersucht.

3.2.2.1 Äthanolaminpuffer pH 10

Der gereinigte Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex wurde in dem oben genannten Puffer verdünnt und im Eisbad inkubiert. Dann wurde die Gesamtaktivität in einem Zeitraum von über drei Stunden verfolgt. Wie aus Abb. 4 zu ersehen ist, sinkt die Aktivität innerhalb 60 Minuten auf 20% ab. Sie bleibt dann für 2 Stunden nahezu konstant.

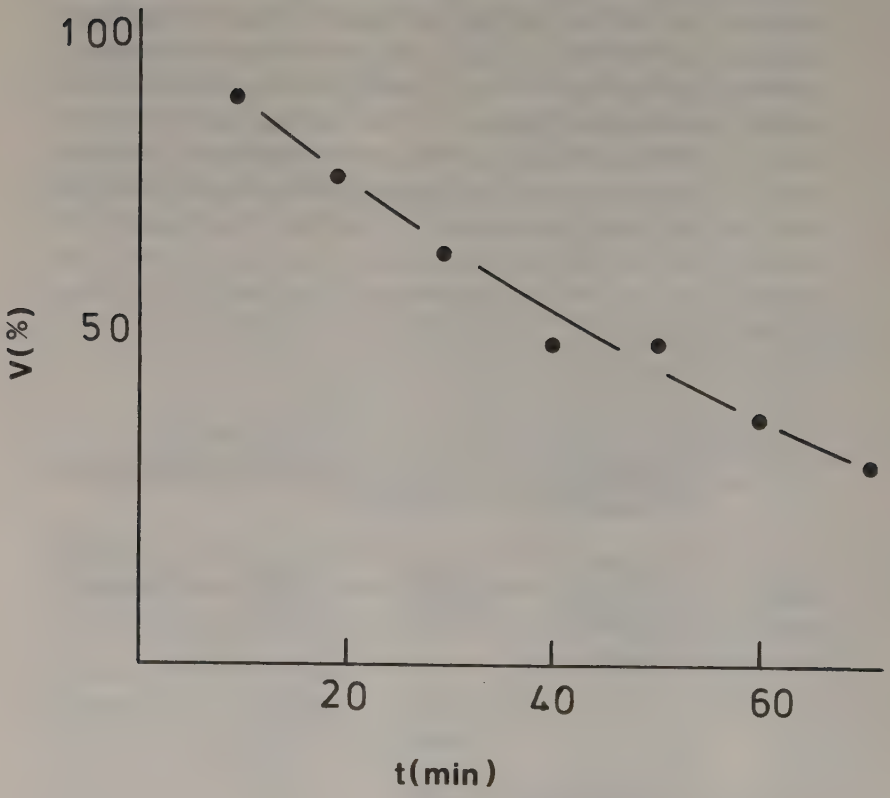

Abb. 4: Abhängigkeit der Gesamtaktivität des gereinigten Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes von der Inkubationszeit in Äthanolaminpuffer pH 10. Die Reaktion wurde im NAD-Test bei 37° C gemessen

3.2.2.2 Stabilität der Aktivität in 5 M Harnstoff

Der gereinigte Komplex wurde in 30 mM kpp, pH 7.5 der 5 M Harnstoff und 1% Ammoniumsulfat enthält, im Eisbad inkubiert. Die Gesamtaktivität (NAD-Test) verschwand innerhalb von 10 Minuten, während die der Dihydroliponamid-Dehydrogenase nach zwei Stunden noch 70% der Kontrolle betrug.

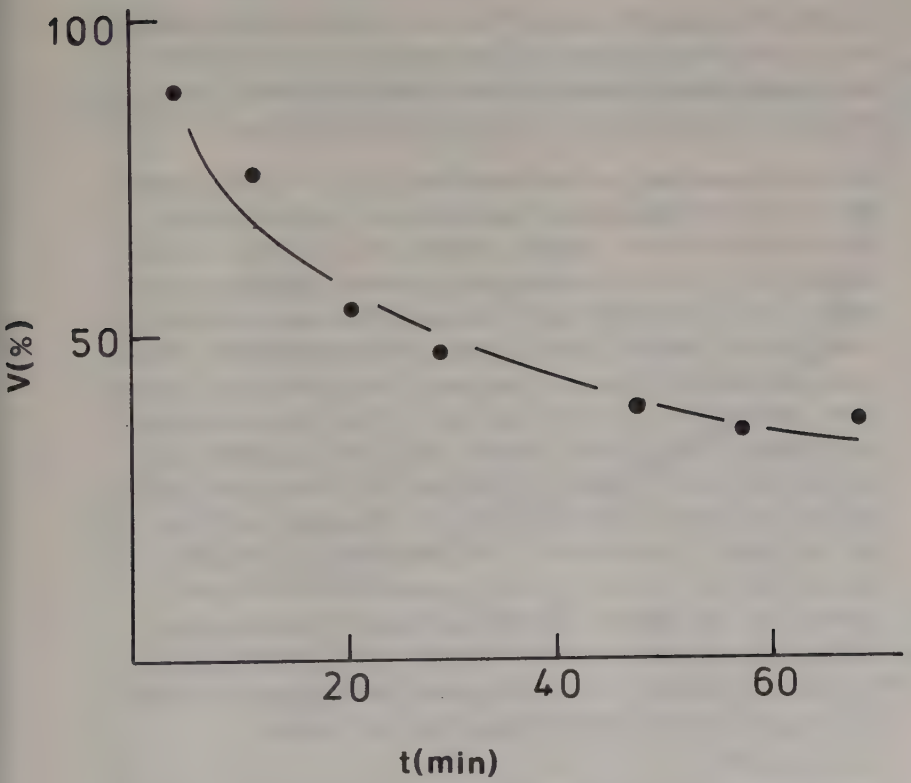

Abb. 5: Abhängigkeit der Aktivität der komplexgebundenen Dihydroliponamid-Transacetylase von der Inkubationszeit in 5 M Harnstoff. Die Reaktion wurde in Transacetylase-Test bei 37° C gemessen.

Die Aktivität der Transacetylase sinkt nach 60 minütiger Inkubation auf ca. 40% und bleibt für eine weitere Stunde nahezu konstant (Abb. 5).

3.2.3 Spaltung des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes

3.2.3.1 Reinigung der Pyruvat-Dehydrogenase-Komponente nach der Methode von Koike et al. (12)

Nachdem festgestellt wurde, daß die Pyruvat-Dehydrogenase sehr empfindlich gegenüber 5 M Harnstoff ist, wurde es vorgezogen, den pH-Schritt zuerst durchzuführen. Die Spaltung erfolgte wie in den Methoden beschrieben.

Nach Auftragen des nativen Komplexes auf die Säule wurde die Pyruvat-Dehydrogenase-Komponente mit Äthanolaminpuffer pH 10 in zwei Banden eluiert. Wie aus Abb. 6 zu ersehen ist, tritt eine kleine und eine große Bande auf. Vogel (72) beobachtete auch diesen Effekt und untersuchte diese beiden Banden. Er fand, daß die kleine Bande inaktives monomeres Enzym ist, während die größere das aktive Dimer darstellt. Die Trennung der Pyruvat-Dehydrogenase-Komponente in die beiden Banden läßt sich größtenteils verhindern durch direktes Auftragen des Enzym-Komplexes auf die Säule ohne Vorinkubation in Äthanolaminpuffer. Der Restkomplex wurde wie in den Methoden beschrieben, mit 0.4 M kpp, pH 7.5 in einer starken Bande eluiert (siehe Abb. 6). Die so getrennte Pyruvat-Dehydrogenase-Komponente besitzt keine Gesamtaktivität, während der Restkomplex weniger als 5% Gesamtaktivität besitzt. Dieser Wert variiert von einer Präparation zur anderen.

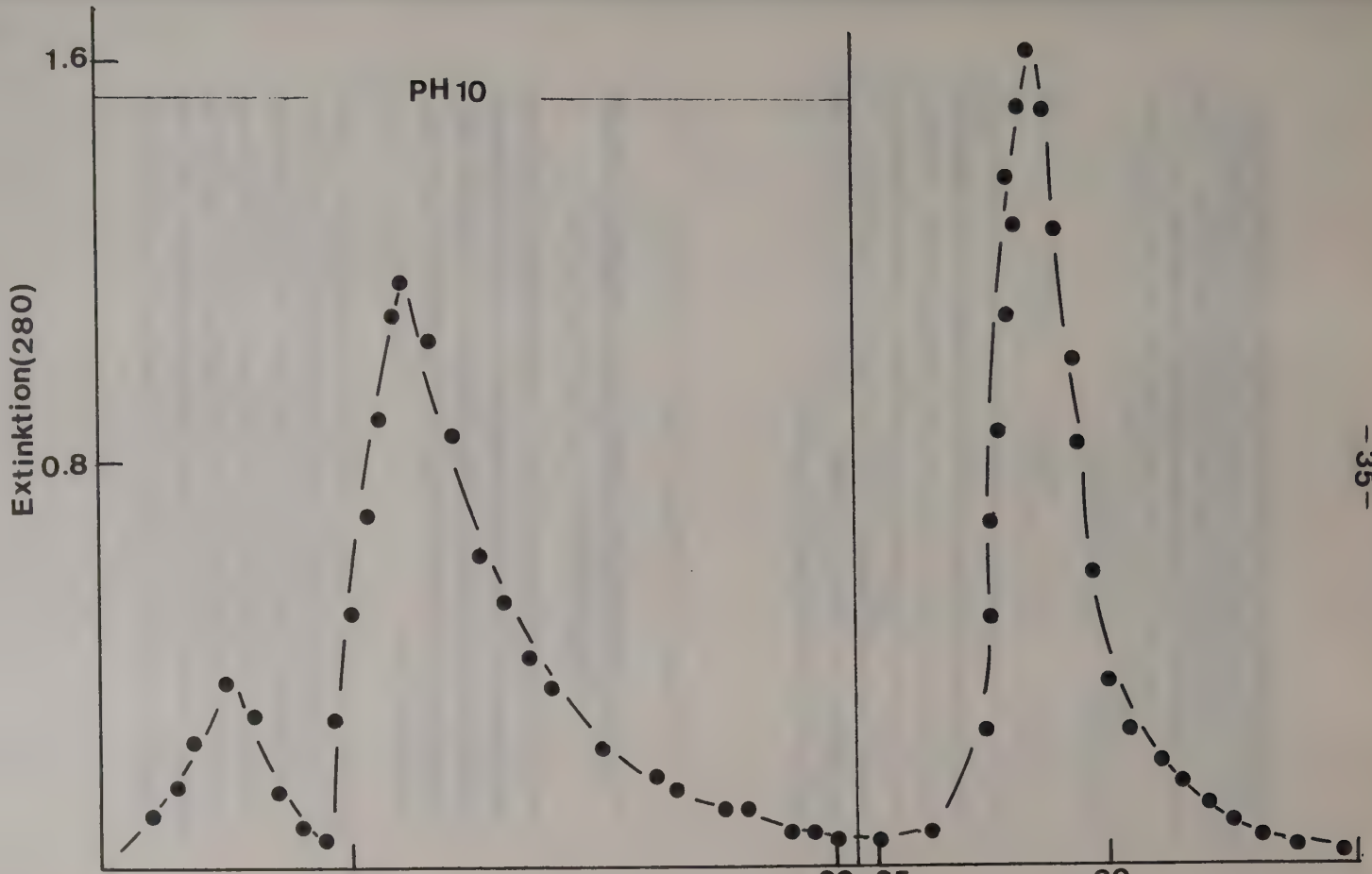

Abb.6

Abb. 6: Spaltung des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes mit Äthanolaminpuffer pH 10 in Pyruvat-Dehydrogenase und Restkomplex (E2E3).Zunächst wurde die Pyruvat-Dehydrogenase mit Äthanolaminpuffer in zwei Banden eluiert und anschließend der Restkomplex mit 0.4 M kpp, pH 7.5 (2 ml pro Fraktion) von der Säule gewaschen. In der Abbildung ist nur das Proteinprofil dargestellt.

Der Restkomplex wurde wie in den Methoden beschrieben, mit 0.4 M kpp, pH 7.5 in einer starken Bande eluiert (siehe Abb. 6). Die so getrennte Pyruvat-Dehydrogenase-Komponente besitzt keine Gesamtaktivität, während der Restkomplex weniger als 5% Gesamtaktivität besitzt. Dieser Wert variiert von einer Präparation zur anderen.

3.2.3.2 Reinigung der Transacetylase-Komponente aus dem Partialkomplex

Der Partialkomplex wurde, wie in den Methoden beschrieben, mit Harnstoff in die Transacetylase und Dihydroliponamid-Dehydrogenase-Komponente gespalten. Tab. 4 zeigt den gesamten Spaltungsverlauf des nativen Komplexes in seine Untereinheiten.

Tab. 4: Spaltung des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes in die Pyruvat-Dehydrogenase und Dihydroliponamid-Transacetylase-Komponenten. In der Tabelle sind die Aktivitäten bzw. die spezifischen Aktivitäten (SA) für die E2- und E3-Komponenten zum Vergleich angegeben

		E2-Aktivität		E3-Aktivität
Enzyme	Protein (mg)	Gesamt-einheiten	SA (EE)	SA (EE)
Komplex	100	18000	180	2600
E1	38	0	0	0
E2	20	15600	780	300
Rest	30	4500	150	8300

3.2.4 Kinetik der Dihydroliponamid-Transacetylase

3.2.4.1 Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Konzentration an Dihydroliponamid

Nach der Reinigung der Transacetylase-Komponente aus dem Komplex wurde der Versuch unternommen, ihre Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Dihydroliponamid-Konzentration zu studieren und sie mit der komplexgebundenen zu vergleichen.

Wie in Abb. 7 gezeigt wird, fällt, sowohl für das isolierte, wie auch für das komplexgebundene Enzym, ein sigmoider Kurvenverlauf auf. Dies wird in der doppelt reziproken Darstellung nach Lineweaver und Burk (Abb. 8) am aufwärts gekrümmten Kurvenverlauf deutlich. Eine sigmoide Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Dihydroliponamid-Konzentration wurde bereits früher für das komplexgebundene

Enzym beschrieben (43). Aus den Daten läßt sich ein $S_{0.5}$-Wert von 2.3×10^{-3} M für das komplexgebundene und 2.7×10^{-3} M für das gereinigte Enzym bestimmen. Aus Abb. 9 wurde ein Hill-Koeffizient von $n_H = 1.3$ berechnet. Aufgrund der Schwerlöslichkeit von Dihydroliponamid in Wasser kann die Reaktionsgeschwindigkeit bei höheren Substratkonzentrationen nicht mehr gemessen werden, so daß die Bestimmung von V und damit $S_{0.5}$ und n_H nicht exakt möglich ist. Diese Ergebnisse sind ein Hinweis dafür, daß die isolierte Transacetylase-Komponente ihre Eigenschaften gegenüber der komplexgebundenen Form noch beibehalten hat.

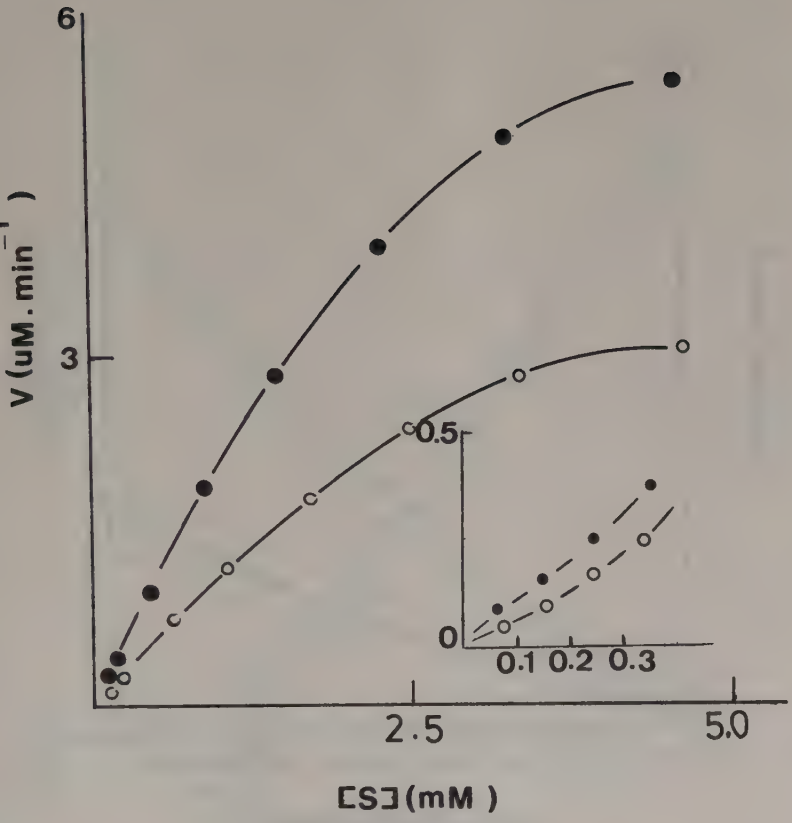

Abb.7: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der Dihydroliponamid-Transacetylase von der Dihydroliponamid-Konzentration. Die Aktivität wurde im Transacetylase-Test bei 37° C mit gereinigtem Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex (●) und mit abgetrennter Dihydroliponamid-Transacetylase (○) gemessen. Die Aktivitätsgeschwindigkeit ist mit µmol s-Acetyl-Dihydroliponamid pro Minute pro mg angegeben

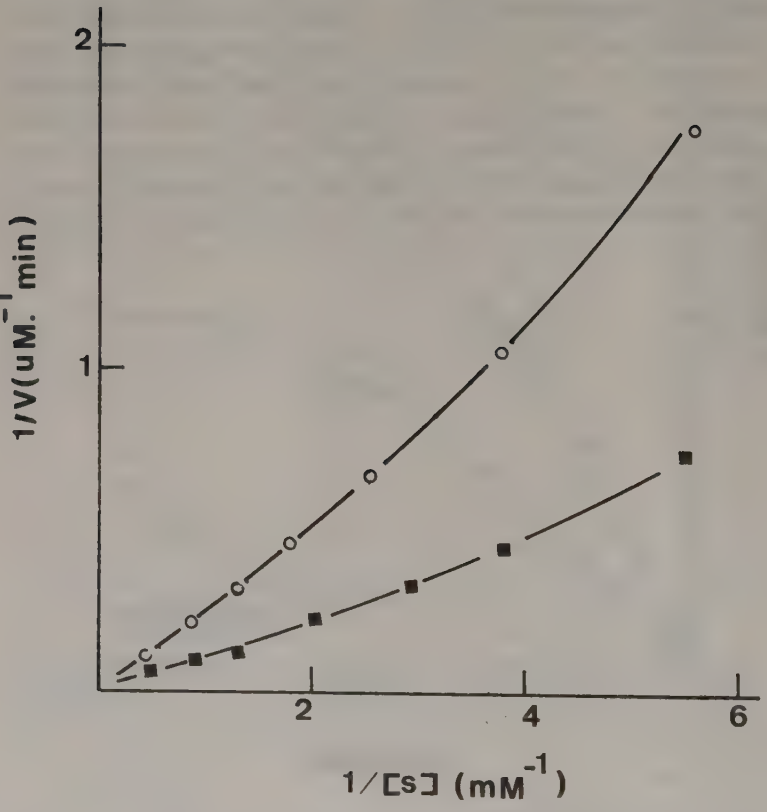

Abb. 8: Lineweaver-Burk-Darstellung der Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der Dihydroliponamid-Transacetylase von der Dihydroliponamid-Konzentration. Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex (■), abgetrennte Dihydroliponamid-Transacetylase (○)

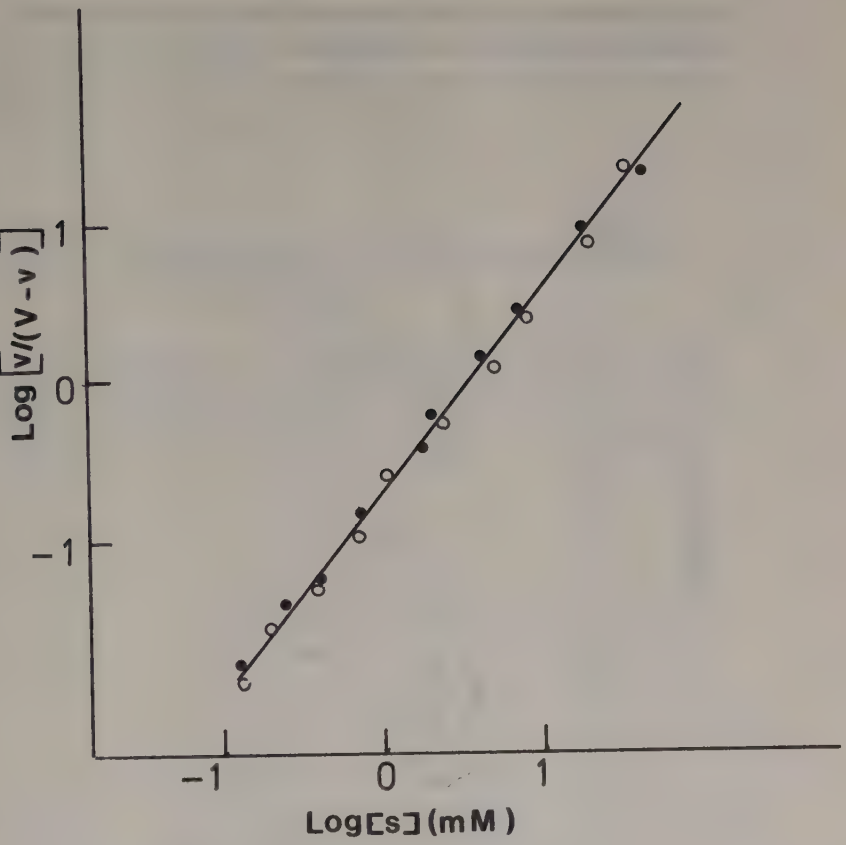

Abb. 9: Hill-Darstellung der Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Konzentration an Dihydroliponamid. Komplexgebundene (●), abgetrennte Dihydroliponamid-Transacetylase (○)

3.2.4.2 Abhängigkeit der Transacetylase-Aktivität vom pH-Wert

Die pH-Abhängigkeit der Transacetylase-Aktivität wurde in saurem Bereich in Acetatpuffer, in neutralem und

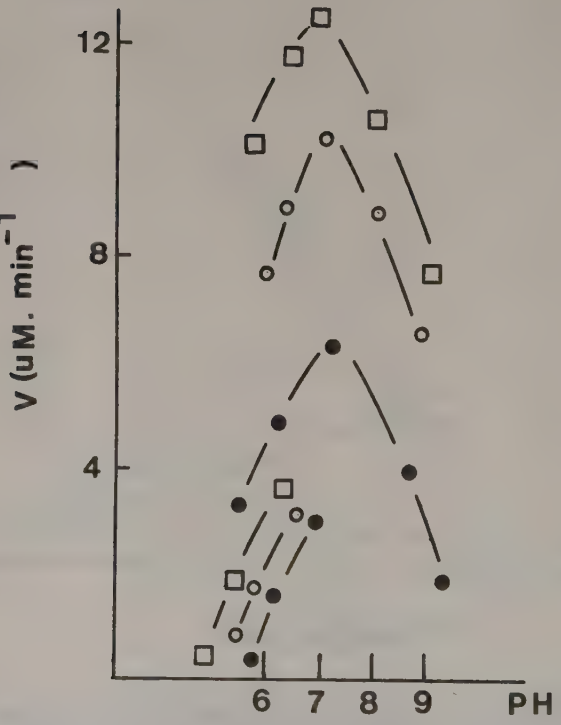

Abb. 10: pH-Optimum der Aktivität der abgetrennten (●), sowie der komplexgebundenen Dihydroliponamid-Transacetylase, (nativer Komplex □), (verdauter Komplex ○) . Die oberen Kurven sind in 0.1 M kpp und die unteren in 0.1 M Acetat-Puffer gemessen worden

alkalischem Bereich in 0.1 M kpp gemessen (Abb. 10). Die Aktivität in kpp ist deutlich höher als in Acetatpuffer. Es ergibt sich ein klares Optimum bei pH 7.2. Die freie, wie die komplexgebundene Transacetylase-Komponente zeigen übereinstimmendes Verhalten sowohl hinsichtlich der Aktivität in den unterschiedlichen Puffern, wie auch hinsichtlich der Lage der Maxima.

3.2.4.3 Abhängigkeit der Transacetylase-Aktivität von der Temperatur

Die Abhängigkeit der Transacetylase-Aktivität von der Temperatur zeigt für die gereinigte wie für die in den Komplex integrierte Komponente den gleichen Kurvenverlauf (Abb. 11).

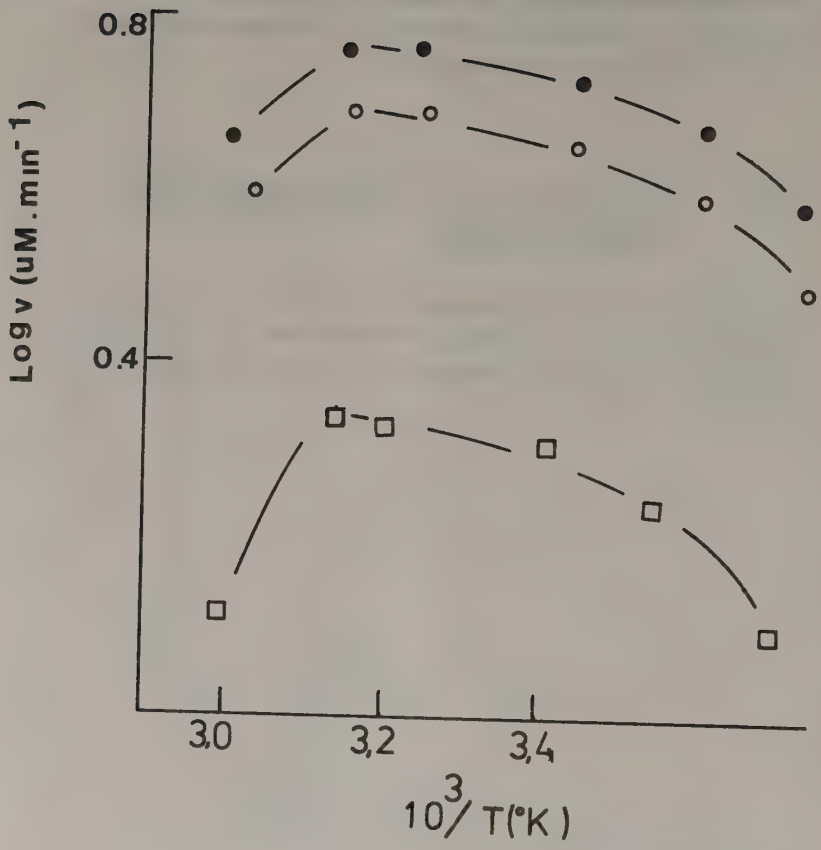

Abb. 11: Arrhenius-Darstellung der Aktivität der Dihydroliponamid-Transacetylase. (□) abgetrennte Transacetylase, sowie (●) komplexgebundene, nativ und verdaut (○)

3.3 Rekonstitution des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes

Um die Rolle der Transacetylase-Komponente im Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex genauer zu durchleuchten, wurde der Aufbau des nativen Komplexes aus den Einzelkomponenten verfolgt. Da die Pyruvat-Dehydrogenase-Komponente die eigentlich regulatorische Untereinheit des Komplexes ist (43), wurde ihr Aggregationsverhalten an die Transacetylase-Komponente, die noch mit der Dihydroliponamid-Dehydrogenase gebunden war (Partialkomplex), studiert.

Die Einzelkomponenten wurden zum einen durch Spaltung des Komplexes im alkalischen Milieu mit Äthanolaminpuffer pH 10, oder aber aus Defektmutanten gewonnen, denen jeweils eine Enzymkomponente fehlt. Die aus den Mutanten gewonnenen Teilenzyme waren nicht den denaturierenden Spaltungsbedingungen ausgesetzt, noch waren sie jemals in einen vollständigen Komplexverband integriert, so daß sie als Modelle für in der Zelle neu synthetisierte Proteine von der Aggregation angesehen werden können. Sie zeigten jedoch in den nachfolgenden Versuchen keine sichtbaren Unterschiede zu den aus dem nativen Komplex abgespaltenen Komponenten, so daß in der folgenden Beschreibung nicht mehr auf diesen Punkt eingegangen werden braucht.

Die Pyruvat-Dehydrogenase-Komponente liegt im Rohextrakt, wie auch in gereinigter Form als dimeres Molekül zweier identischer Polypeptidketten der Größe 100 000 Daltons vor und zeigt keinerlei Aggregationstendenzen sowohl gegenüber sich selbst, wie auch gegenüber der isolierten Dihydroliponamid-Dehydrogenase-Komponente, sondern bindet nur an die Transacetylase, wie durch Rohrzuckergradientenzentrifugation nachgewiesen werden konnte.

3.3.1 Zeitverlauf der Rekonstitution

Die isolierte Pyruvat-Dehydrogenase-Komponente ist in der Lage, durch Addition an den Partialkomplex einen katalytisch voll aktiven Enzymkomplex zu rekonstruieren, der in Größe und Aktivität dem nativen Komplex entspricht (12). Durch Zugabe der Pyruvat-Dehydrogenase-Komponente zum Partialkomplex in Gegenwart der für den katalytischen Umsatz erforderlichen Substrate und Kofaktoren kann man die Entstehung von enzymatisch aktiven Komplex direkt anhand des Auftretens der Gesamtreaktion, das heißt des Entstehens von NADH verfolgen (Reaktion 1). Dieser Vorgang spielt sich jedoch nicht augenblicklich nach der Zugabe der Komponente ab, sondern erst nach einer Verzögerungsphase von einigen Minuten wird eine lineare Steady-State-Reaktion erreicht. Da jedoch bei diesem Versuch nicht die Bindung der Partner direkt gemessen wird, sondern das Auftreten der Gesamtreaktion des Enzymkomplexes, mag diese Verzögerungsphase ein Hinweis dafür sein, daß nach dem eigentlichen Bindungsschritt noch Prozesse, wie Umlagerung oder Konformationsänderungen sich abspielen, die geschwindigkeitsbestimmend für die Ausbildung des aktiven Komplexes sind, nach dem Schema:

$$E_1 + RK \rightleftharpoons \underset{\text{inaktiv}}{PDC} \rightleftharpoons \rightleftharpoons \rightleftharpoons \underset{\text{aktiv.}}{PDC}$$

Solche Isomerisierungsprozesse sollten erster Ordnung und ihre Geschwindigkeitskonstanten konzentrationsunabhängig sein, während die Bindungsschritte zumindest zweiter Ordnung sind und damit konzentrationsabhängige Geschwindigkeitskonstanten besitzen. Die Dauer der Verzögerungsphase läßt sich durch Rückextrapolation der Steady-State-Reaktion auf Null bestimmen (Abb. 12).

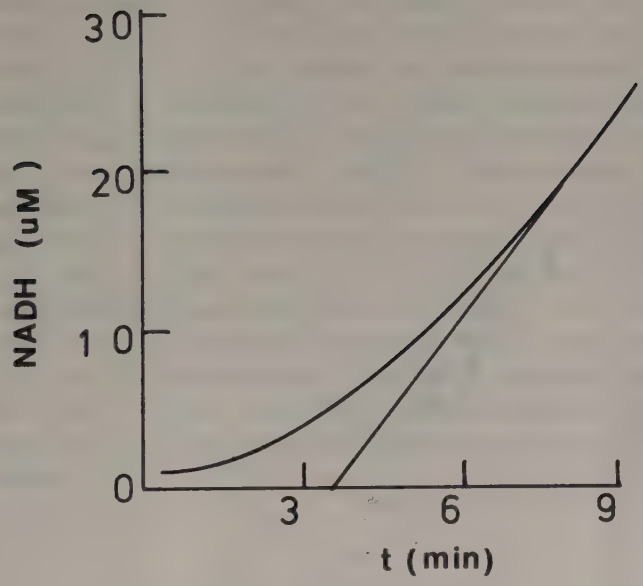

Abb. 12: Zeitlicher Verlauf der enzymatischen Reaktion des reassoziierten Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes. Zu 0.3 µg Restkomplex wurden 0.1 µg Pyruvat-Dehydrogenase direkt in die Küvette zugegeben und die Reaktion sofort gestartet. Die Kurve ist dem Schreiberdiagramm entnommen

Zugabe von steigenden Mengen der Pyruvat-Dehydrogenase-Komponente bei Konstanthaltung der Konzentration des Partialkomplexes führt zu einer Reduktion der Zeitdauer der Verzögerungsphase. Man erhält wie in Abb. 13 gezeigt, eine lineare Abhängigkeit der Verzögerungszeit vom Logarithmus der Konzentration der Pyruvat-Dehydrogenase-Komponente. Dies ist charakteristisch für eine Reaktion erster Ordnung, wobei sich der Wert der Geschwindigkeitskonstanten aus der Steigung ergibt.

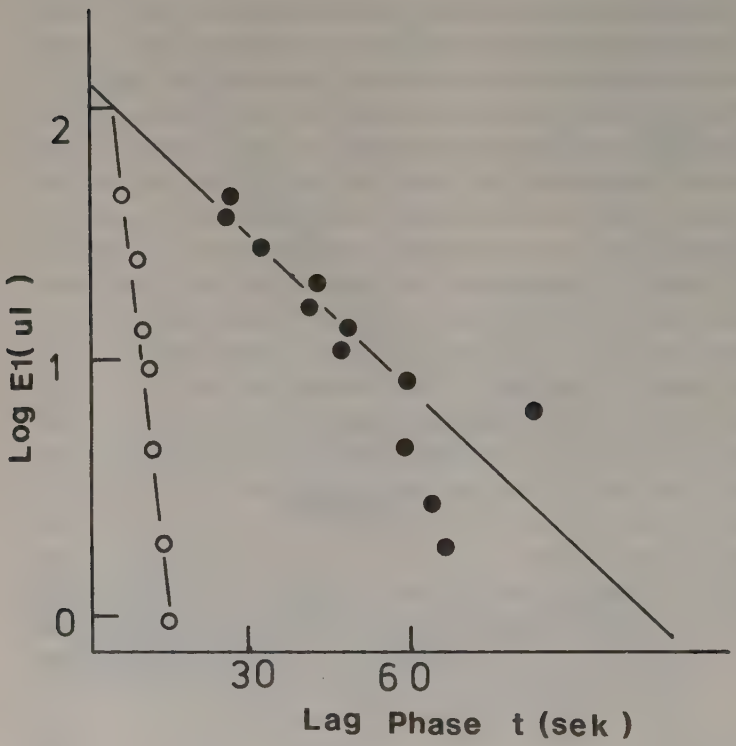

Abb. 13: Abhängigkeit der Lag-phase der Reaktivierung von der Konzentration der Pyruvat-Dehydrogenase-Komponente. 9.6 und 96 µg (●, ○) des Restkomplexes wurden in 1 ml Testmischung, die alle Substrate und Coenzyme für die Gesamtreaktion enthält, bei 37° C vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe einer bestimmten Menge der Pyruvat-Dehydrogenase-Komponente gestartet. Die Lag-phase wurde definiert als die Zeit, die notwendig ist, bis die Reaktion eine lineare Steady-State-Rate erreicht hat.

In einem zweiten Versuch wurde die Ausgangsmenge des Partialkomplexes, bei sonst identischer Versuchsbedingung zehnfach erhöht. Wie aus Abb. 13 zu ersehen ist, erhält man auch in diesen beiden Fällen eine lineare Abhängigkeit. Die Steigung ist ebenfalls um den Faktor 10 angestiegen, so daß man offensichtlich einen Prozeß zweiter Ordnung vorliegen hat. Unter Annahme einer Reaktion pseudo-erster Ordnung, was durch die strikte Proportionalität zwischen Steigung und Konzentration hinlänglich gerechtfertigt erscheint, ergibt sich ein Wert von 3.5×10^6 M^{-1} sec^{-1} für die Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung. Es wird dadurch offensichtlich, daß der Bindungsprozeß tatsächlich der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Reassoziation des Komplexes ist und es erscheint gerechtfertigt, die Steady-State-Reaktion als direktes Maß für die Reassoziation zu nehmen.

3.3.2 Temperaturabhängigkeit der Verzögerungsphase

Abb. 14 zeigt die Temperaturabhängigkeit der Dauer der Verzögerungsphase, sowie die der nachfolgenden Enzymreaktion. Daraus sieht man, daß die Dauer der Verzögerungsphase mit steigender Temperatur abnimmt, während die Reaktionsgeschwindigkeit (Steady-State) zunimmt.

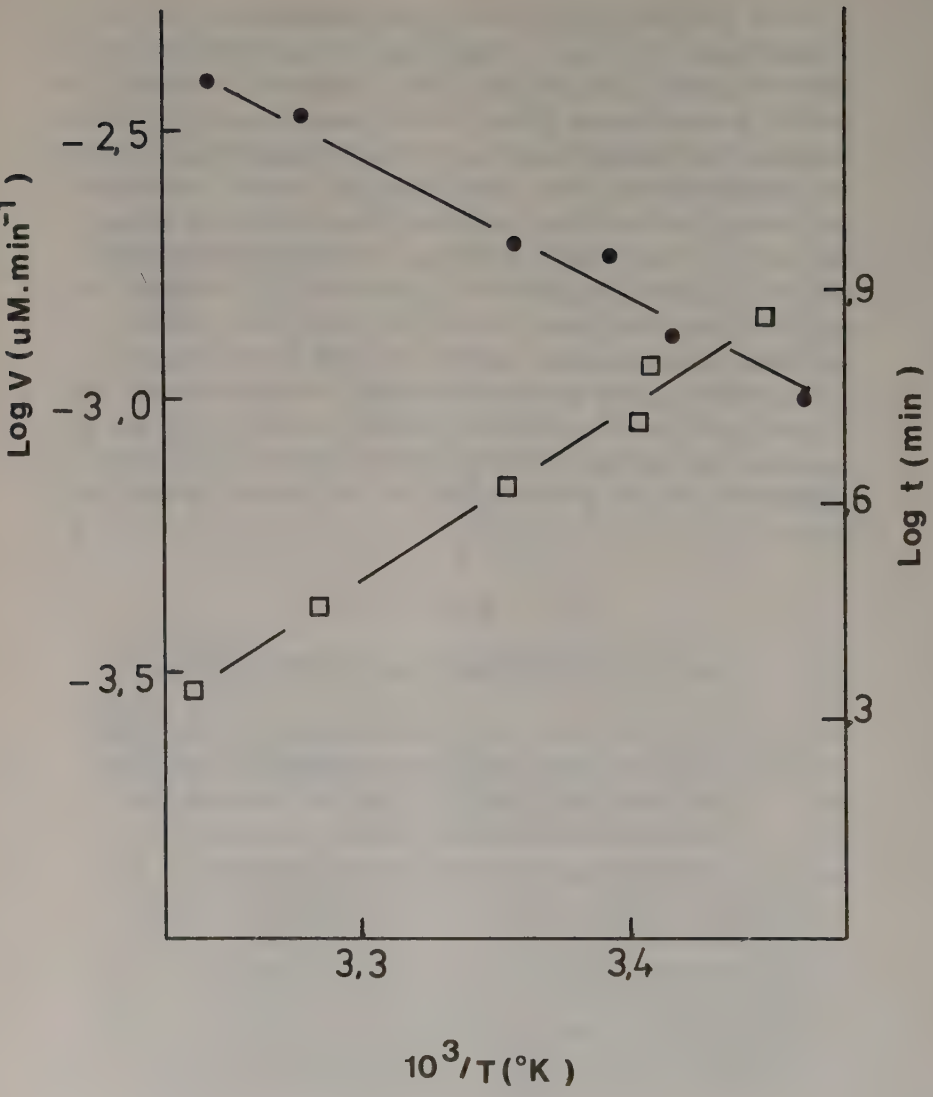

Abb. 14: Arrhenius-Darstellung der Lag-Phase der Reaktivierung (□) und die Steady-State-Geschwindigkeit der Daten von Abb. 15

3.4 Bindung der Pyruvat-Dehydrogenase-Komponente an den Partialkomplex

Die Abhängigkeit der Steady-State-Geschwindigkeit von der Konzentration an zugegebener Pyruvat-Dehydrogenase-Komponente bei konstanter Menge an Partialkomplex ist in Abb. 15, 16 aufgezeichnet.

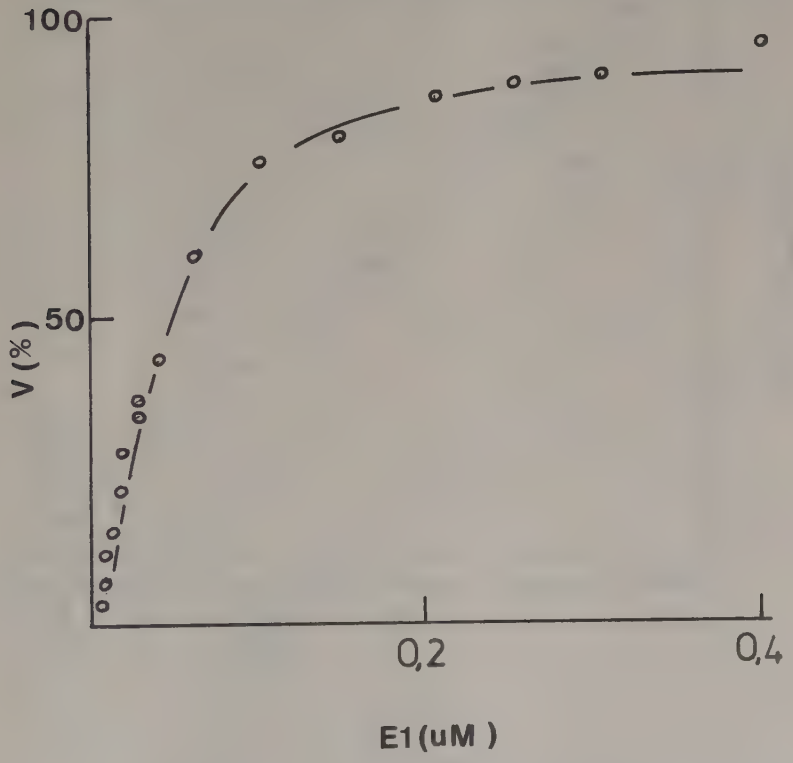

Abb. 15: Abhängigkeit der Reaktivierung des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes von der Konzentration der Pyruvat-Dehydrogenase. 1.5 µg Restkomplex (E) wurden in 1 ml Testmischung, die alle nötigen Substrate und Cofaktoren enthält, bei 37° C in der Küvette vorinkubiert, dann wurde die Steady-State-Reaktion in Abhängigkeit der zugegebenen E1-Menge gemessen

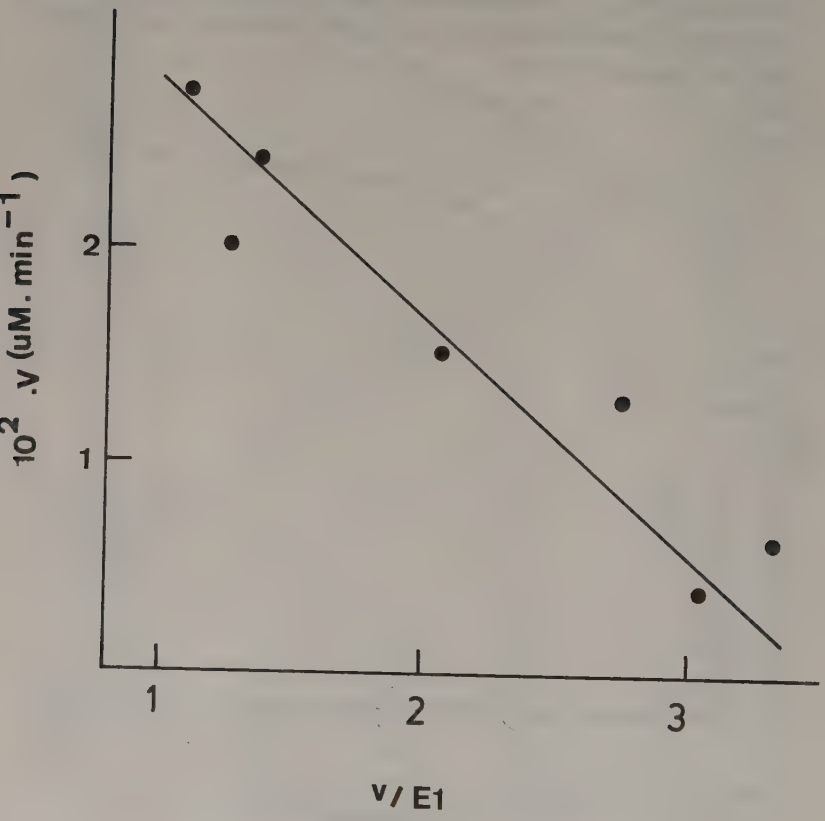

Abb. 16: Eadie-Hofstee-Darstellung der Reaktivierung des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes mit der Pyruvat-Dehydrogenase-Komponente

Daraus läßt sich ein Wert von 1.1-1.4 µg E1 pro 1 µg Restkomplex berechnen, der zur Sättigung nötig ist.

In der von A Stockell (73) vorgeschlagene Linearisierungsmethode erhält man deutlich einen biphasischen Verlauf, der erst bei höheren Konzentrationen in eine Gerade übergeht (Abb. 17). Die aus diesem linearen Bereich zu bestimmende

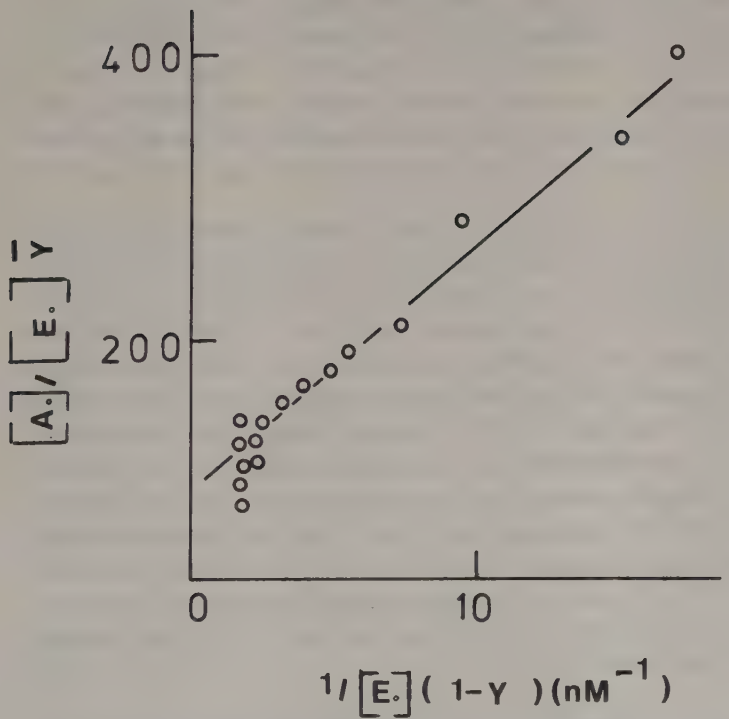

Abb. 17: Daten aus Abb. 15 in der Darstellung nach Stockell (72)

Assoziationskonstante hat den Wert $5 \times 10^7 M^{-1}$. Ein Grund für diese Nichtlinearität mag darin zu suchen sein, daß, wie oben bereits diskutiert, die Reassoziation ein komplexer Vorgang ist und tatsächlich eine Oberlagerung verschiedener Prozesse beobachtet wird. Es ist deshalb wünschenswert, die Bindungsexperimente mit einer Methode zu überprüfen, die die Bindung direkt sichtbar macht. Normale Bindungsexperimente, wie Gleichgewichtsdialyse oder Ultrafiltration sind hier wenig brauchbar, da beide Reaktionspartner selbst Makromoleküle sind. Wir haben daher versucht, die Reassoziation über die Beeinflussung der Fluoreszenzen der Komponenten sichtbar zu machen.

3.4.1 Bindungsmessung durch Fluoreszenzenergieübertragung

Enge nachbarschaftliche Anordnungen bestimmter Gruppen auf ein und demselben Makromolemül lassen sich oftmals durch das Prinzip der strahlungslosen Fluoreszenzenergieübertragung erkennen. Die betreffenden Gruppierungen müssen daher fluoreszierende Chromophore enthalten bei denen sich das Fluoreszenzspektrum der einen Verbindung (Donor) mit dem Absorptionsspektrum der anderen Verbindung (Akzeptor) zumindest partiell überlagert. Wenn diese beiden Farbstoffe nicht weiter als 6 nm voneinander entfernt sind, sollten sie diesen Effekt zeigen, das heißt, daß ein Teil der Anregungsenergie des Donors auf den ursprünglich nicht angeregten Akzeptor übertragen und diesen damit zur Fluoreszenz angeregt wird. Dieser Umstand ist auch ausgenutzt worden, um Entfernungen zwischen bestimmten Zentren eines Makromoleküls auszumessen (21, 74).

Der Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex hat einen Durchmesser von ca. 40 nm das heißt einen Umfang von 125 nm (75). Energieübertragung zwischen verschiedenen Gruppen, die auf der Oberfläche des Komplexes angeordnet sind, ist damit auf eine maximale Entfernung von 1/20stel des Umfanges beschränkt. Gruppierungen mit größeren Entfernungen zueinander können damit grundsätzlich nicht mehr erfaßt werden. Bei einer angenommenen etwa gleichmäßigen Verteilung von 24 Polypeptidketten der Pyruvat-Dehydrogenase-Komponente auf der Oberfläche des Komplexes dürfte damit eine Energieübertragung jeweils nur zwischen unmittelbar benachbarten Untereinheiten zu erwarten sein, während solche, die durch eine oder mehrere Polypeptidketten voneinander getrennt sind, nicht mehr erfaßt werden können.

Eine bereits auf dem Partialkomplex gebundene Pyruvat-Dehydrogenase-Komponente, die zum Beispiel mit einem Donor-Chromophor beladen ist, sollte somit signalisieren

können, ob eine nachfolgend bindende Untereinheit in direkter Nachbarschaft oder aber in größerer Entfernung angelagert wird, falls letzteres mit einem Akzeptormolekül markiert ist. Auf diese Weise läßt sich also die relative Orientierung von bindenden zu den bereits gebundenen Untereinheiten erkennen. Dies sollte wiederum Rückschlüsse auf die Art der Bindung zulassen.

Die Fluoreszenzenergieübertragung ist ein empfindlicher Vorgang und hängt, wie bereits in der Einleitung ausführlich diskutiert, von mehreren Faktoren ab, die nicht immer genau bestimmbar sind. Wesentlich ist vor allem die Wahl eines geeigneten Donor-Akzeptor-Paares, das eine gute Obertragungseffizienz gewährleistet und auch an geeigneten Stellen des Komplexmoleküls bindet.

Eine Reihe von Chromophoren wurde ausprobiert (Tab. 5). Am geeignetsten haben sich Fluorescamin als Donor und Fluoresceinisothiocynat als Akzeptor gezeigt. Beide binden kovalent an Aminogruppen des Proteins (76, 77). Für den Versuch ist eine relativ unspezifische Mehrfachbindung pro Untereinheit von Vorteil, um die Möglichkeit einer Energieübertragung zu vergrößern.

Die Fluoreszenzspektren beider Chromophore sind in Abb. 18 gezeigt. Fluorescamin hat ein Fluoreszenzmaximum bei 480 nm, während Fluorescein bei 495 nm ein Absorptionsmaximum zeigt, so daß eine partielle Oberlappung beider Banden auftritt. Dies bedingt zwar eine reduzierte Obertragungseffizienz, doch wird dies durch die multiple Bindung pro Untereinheit ausgeglichen.

Die Bindung der Farbstoffe an die Proteinkomponente führt zu keiner nachweisbaren spektralen Verschiebung. Zur Messung der Energieübertragung wurde das Fluorescamin bei 395 nm angeregt und die Erhöhung der Fluoreszenzintensität des Fluoresceins bei 520 nm gemessen. Aufgrund der Oberlappung beider Spektren regt man unter diesen Be-

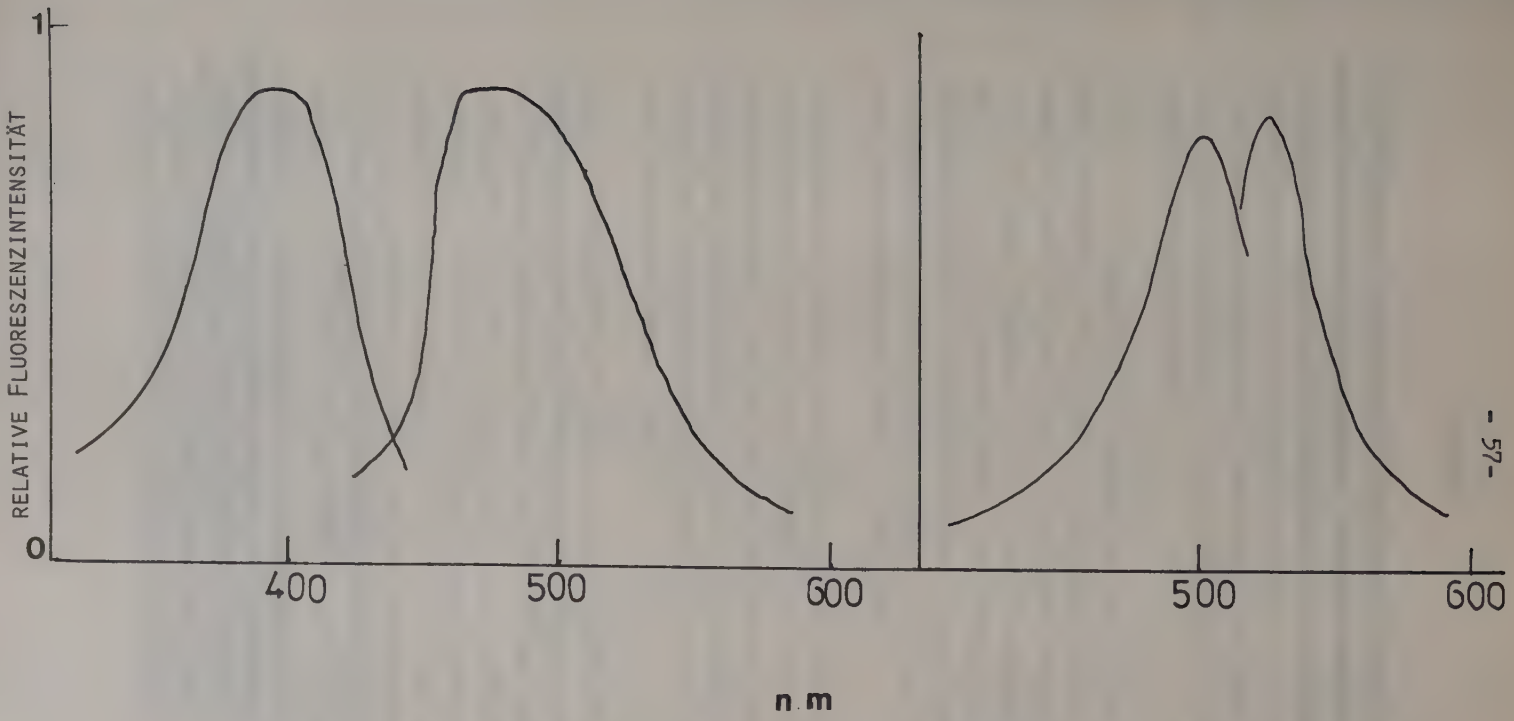

Abb. 18: Fluoreszenzspektrum von Fluorescamin (A) und Fluorescein-markierter Pyruvat-Dehydrogenase-Komponente (B). In beiden Diagrammen ist das Anregungsspektrum links und das Emissionsspektrum rechts gezeichnet. 40 µg Fluorescamin und 20 µg Fluorescein wurden verwendet, die Sensitivität im linken Diagramm ist dreimal höher als die des rechten

dingungen auch den Akzeptor in Abwesenheit des Donors an, doch findet man, wie Abb. 19 zeigt, eine deutliche Fluoreszenzerhöhung, wenn sowohl donor- und akzeptorbeladene

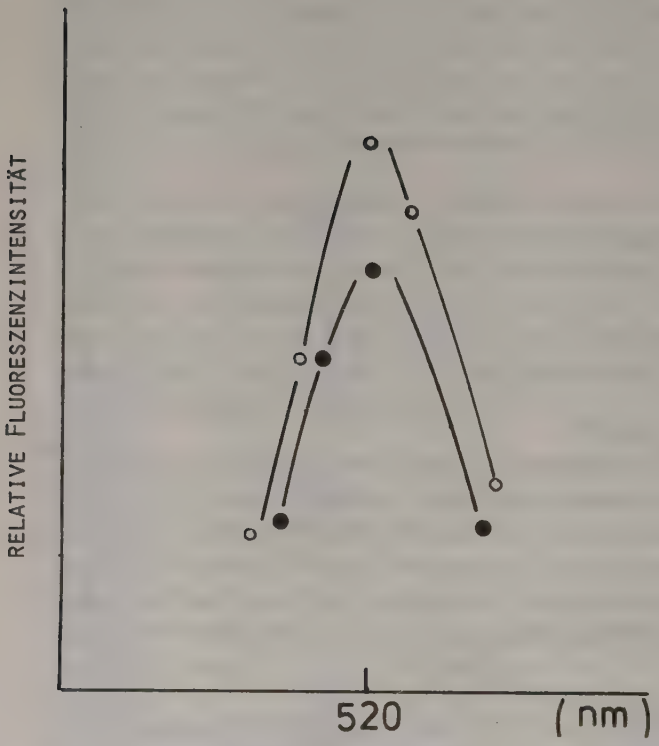

Abb. 19: Emissionsspektrum von fluorescamin- und fluoresceinmarkierter Pyruvat-Dehydrogenase, die an dem Restkomplex assoziiert sind. Die Messung wurde am Ende des Titrationsversuchs, das heißt nach der Sättigung, durchgeführt. (o) Probe, (●) Kontrolle. Angeregt wurde bei 395 nm

Pyruvat-Dehydrogenase-Komponenten gleichzeitig an den Partialkomplex gebunden werden, gegenüber einer gleichartigen Mischung der verschiedenen markierten Komponenten in Abwesenheit des Partialkomplexes oder einer Partial-Komplex-Akzeptor-Mischung (ohne Donor). Es zeigt sich damit, daß die nachbarschaftliche Bindung durch Energieübertragung erkennbar wird.

Durch die Bindung der Chromophore an das Protein erleiden die Komponenten eine gewisse Aktivitätseinbuße, die, wie Abb. 20 zeigt, im Falle des Fluorescamin wesentlich stärker ist, als beim Fluorescein. Dies liegt im wesentlichen daran, daß die deutlich stärkere Fluoreszenzintensität des Fluoresceins eine eingehende Markierung der Komponente mit dem Fluorescamin notwendig macht, um etwa vergleichbare Fluoreszenzintensitäten zu erhalten.

Wie jedoch der Verlauf der Sättigungskurve sowie die Zuckergradientzentrifugation zeigt (Abb. 21) wird die Bindungsfähigkeit der markierten Komponenten nicht beeinflußt. Die Inkubationszeit und das Verhältnis Protein zu Farbstoffe wurden so gewählt, daß man parallel Aktivität und Fluoreszenz messen kann.

Um das Bindungsverhalten der Pyruvat-Dehydrogenase-Komponente an den Partialkomplex zu messen, haben wir der vorgelegten konstanten Menge des Partialkomplexes eine geringe Menge an donor-markierter Pyruvat-Dehydrogenase zugesetzt, die, hinsichtlich der rekonstituierten Gesamtaktivität 5% Sättigung entspricht, so daß statistisch eine Polypeptidkette auf ein Molekül Partialkomplex bzw. ein Dimer auf zwei Komplexmoleküle kommen. Die Mischung wurde bei 4^{o} C 30 Minuten vorinkubiert. Eine längere Inkubationszeit erbrachte keinen Unterschied im Versuchsergebnis. Nach der Vorinkubation wurde mit akzeptormarkierter Komponente bis zum Erreichen der Sättigung titriert. In einem Kontrollversuch wurde die Titration bei gleichen Mengen an donor- bzw. akzeptormarkierten Kompo-

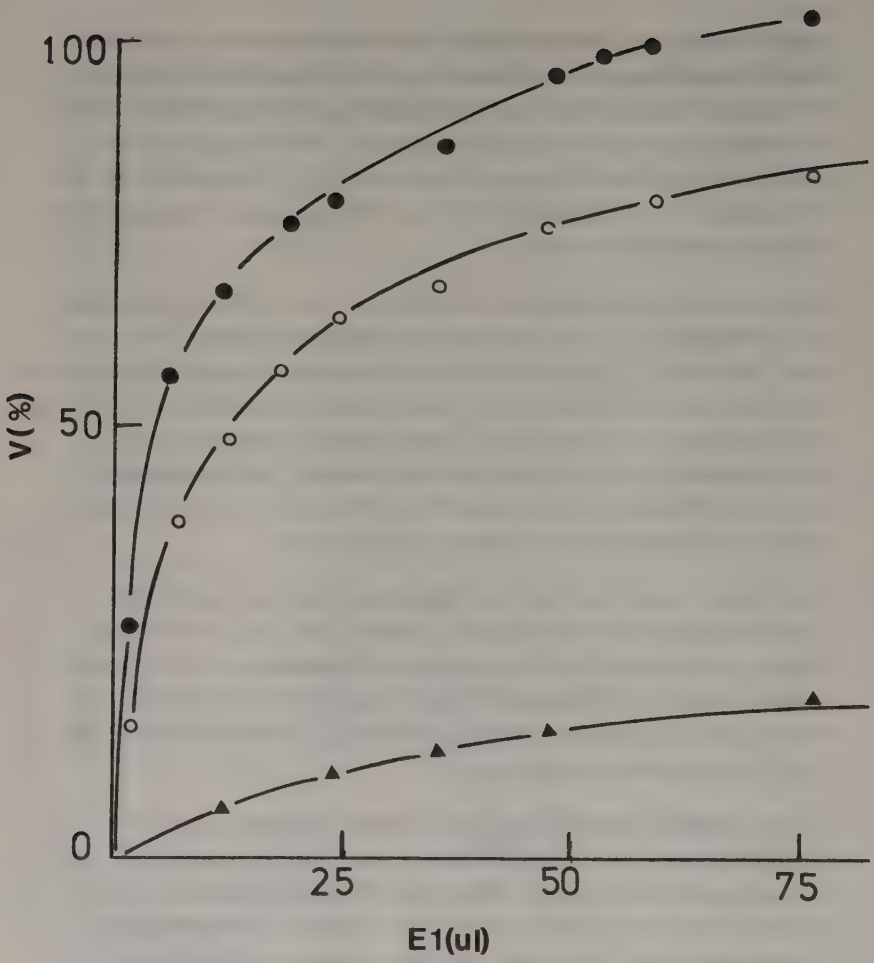

Abb. 20: Sättigung des Restkomplexes mit der markierten Pyruvat-Dehydrogenase-Komponeten. 1.9 µg Restkomplex wurden konstant gehalten und steigende Mengen der markierten Komponenten dazu titriert. Die Steady-State-Geschwindigkeit der Gesamtreaktion im NAD Test wurde als Maß der Reaktivierung bei 37° C gemessen. (●) Native Pyruvat-Dehydrogenase, (○) fluoresceinmarkierte und (▲) fluorescaminmarkierte Pyruvat-Dehydrogenase

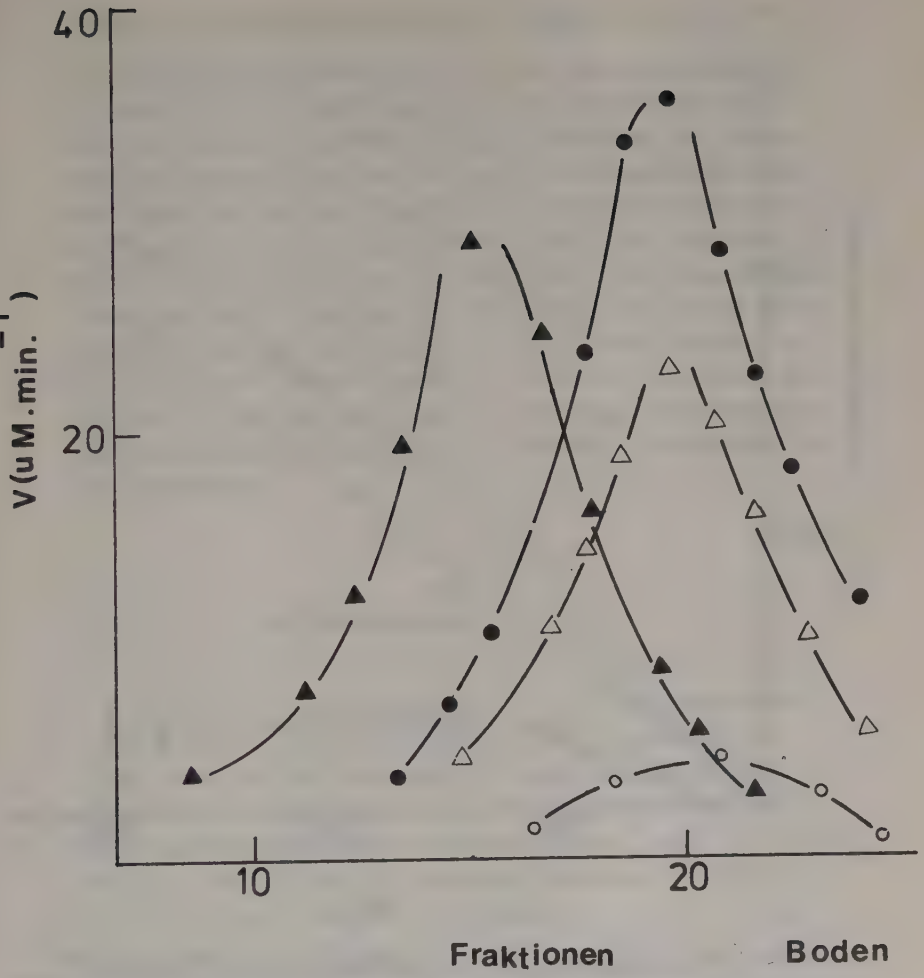

Abb. 21: Rohrzuckergradienten Zentrifugation eines Restkomplexes, der mit fluorescaminmarkierter (○) und fluoresceinmarkierter (△) Pyruvat-Dehydrogenase über Nacht bei 4° C inkubiert wurde. In 100 µl 0.1 M kpp, pH 7.5 wurden jeweils 0.2 mg Restkomplex mit 0.2 mg markierter Pyruvat-Dehydrogenase inkubiert. Als Kontrolle diente eine Probe des Restkomplexes allein. Aktivitätsprofile: Gesamtaktivität; (○) E1-Fluorescamin, (△) E1-Fluorescein. Dihydroliponamid-Dehydrogenase: (●) E1-Fluorescamin, (▲) Kontrolle

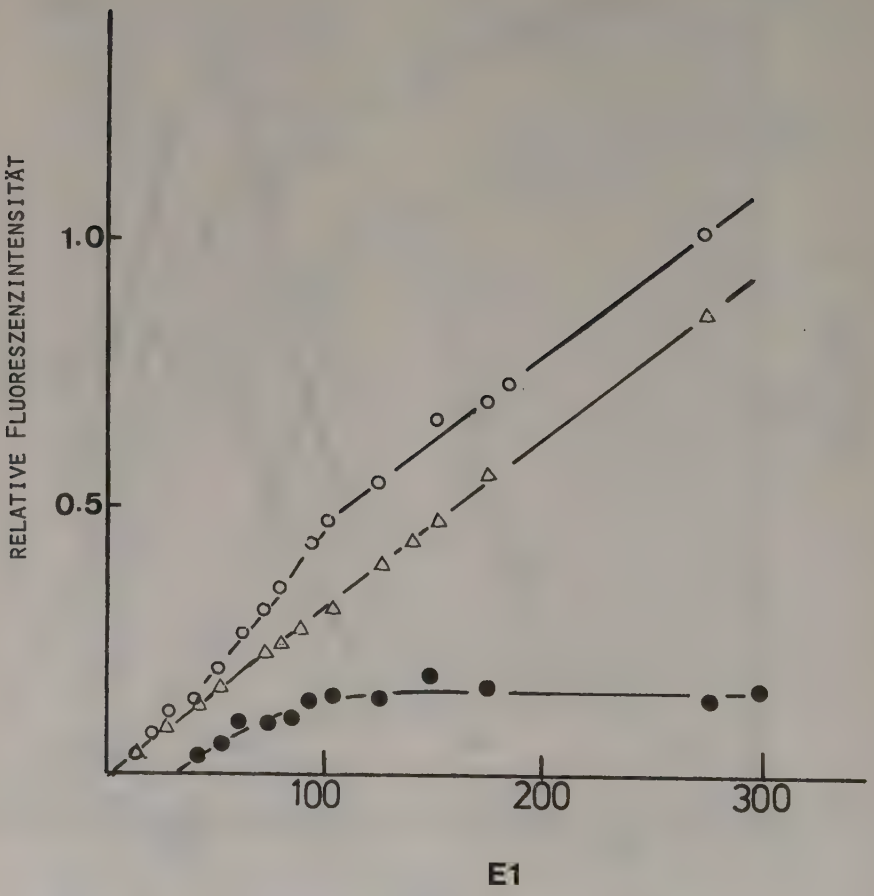

Abb. 22: Fluoreszenz-Titration des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes mit der markierten Pyruvat-Dehydrogenase-Komponente. 100 µg Restkomplex wurden mit 20 µg fluorescaminmarkierter Pyruvat-Dehydrogenase in 1 ml Endvolumen 16 Stunden bei 4° C inkubiert und anschließend wurde mit der Titration der fluoresceinmarkierten Pyruvat-Dehydrogenase stufenweise in Zeitabständen von 5 Minuten angefangen. Die Anregung erfolgte stets bei 395 nm und die Emission wurde bei 520 nm verfolgt. (△) Kontrolle ohne Restkomplex, (○) Probe, (●) Differenz zwischen Probe und Kontrolle .

nenten in Abwesenheit des Partialkomplexes durchgeführt.

Aus Abb. 22 ist zu erkennen, daß bei der Kontrolle ein linearer Anstieg der Fluoreszenz, bedingt durch die Eigenfluoreszenz des Fluoresceins, auftritt. In Gegenwart des Partialkomplexes findet man demgegenüber einen steileren Anstieg der Fluoreszenz, der aber schließlich in eine Parallele zur Geraden der Kontrolle einmündet. Durch Substraktion beider Kurven erhält man eine sigmoide Sättigungskurve, aus der das Bindungsverhalten der Pyruvat-Dehydrogenase-Komponente an den Partialkomplex ersichtlich wird. Die veränderte Kurvenform gegenüber den Reassoziationsversuchen, die im vorhergehenden Abschnitt gezeigt wurden, erklärt sich aus dem verschiedenartigen Versuchsansatz.

3.5 Abstandsmessung

Die Methode der strahlungslosen Fluoreszenzenergieübertragung läßt sich auch ausnutzen, den räumlichen Abstand zwischen dem Akzeptor- und dem Donormolekül zu bestimmen. Wenn diese Chromophoren an geeignete Stellen des Enzymmoleküls plaziert werden können, dann lassen sich auf diese Weise auch Entfernungen zwischen verschiedenen Zentren eines Enzymmoleküls bestimmen.

Hammes und seine Mitarbeiter haben versucht, auf diese Weise die Abstände zwischen den verschiedenen katalytischen Zentren des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes zu bestimmen (16, 17, 18). Die Bestimmung dieser Entfernung ist wichtig für die Diskussion der Theorie eines zwischen den verschiedenen aktiven Zentren schwingenden Lysyl-Lipoyl-Säurearms.

Bei den Studien des Aggregationsverhaltens der Enzymkomponenten dieses Komplexes im Rahmen dieser Arbeit wurden auch gewisse Hinweise auf Abstände bestimmter aktiver Zentren voneinander gewonnen, die hier kurz dargestellt werden sollen.

Es wurden verschiedene Chromophore getestet, die mit SH- bzw. NH_2-Gruppen des Proteins kovalente Verbindungen eingehen, diese sind in Tabelle 5 dargestellt.

Tab. 5: Anregungs- und Emissionsmaxima von Fluoreszenzfarbstoffen, die an Proteine binden und die zur Messung der strahlungslosen Energieübertragung verwendet wurden

Fluoreszenzfarbstoffe	Maximum der Anregung (nm)	Maximum der Emission (nm)	Bindung am Protein
Dansylaziridin	345	480	-SH
N-Pyren-Maleinimid	342	405	-SH
Fluoresceinisothiocyanat	495	521	$-NH_2$
Fluorescamin	395	480	$-NH_2$
FAD	480	520	Cofaktor

Geeignete Donor-Akzeptor-Paare wurden zunächst am Beispiel des Serumalbumins getestet. Dabei wurden zwei Proben von Serumalbumin, wie in den Methoden beschrieben, mit den Fluoreszenzfarbstoffen markiert und der Oberschuß an Farbstoffen durch intensive Dialyse getrennt. Die Markierung war so durchgeführt, daß eine Probe mit dem ge-

wählten Donor-Chromophor und die andere mit dem Akzeptor-Chromophor markiert wird. Danach wurde eine Mischung aus beiden Proben im Verhältnis 1:1 hergestellt und 6 Stunden in 6 M Harnstofflösung (Endkonzentration) inkubiert. Anschließend wurde die Mischung dialysiert um den Harnstoff zu entfernen und die Reassoziation der Polypeptidketten des Proteins herbeizuführen. Dabei werden auch zu größerem Anteil Untereinheiten, die verschieden markiert sind, assoziieren um Donor- und Akzeptorchromophore in einen günstigen Abstand zueinander zu bringen und um Fluoreszenzenergieübertragung zu ermöglichen.

Abb. 23 zeigt das Ergebnis eines solchen Versuches. Hier wurde Dansylaziridin als Donorchromophor und Fluorescein als Akzeptor genommen. Eine Probe, die entsprechend behandeltes donor- und akzeptormarkiertes Serumalbumin enthält, zeigt ein deutliches Emissionsmaximum des Akzeptorchromophors bei 520 nm bei Anregung des Donors. Dieses Maximum ist eindeutig viel höher als das von Kontrollen, die jeweils nur donormarkierte oder akzeptormarkierte Proteinproben enthalten. Der Unterschied des Emissionsmaximums bei 480 nm zwischen Donor-Protein allein und Donor-Akzeptor-Protein beruht zum einen auf dem Empfindlichkeitsbereich und zum anderen auf dem Quencheffekt des Akzeptors.

Nachdem es gelungen war am Beispiel des Serumalbumins zu zeigen, daß die strahlungslose Fluoreszenzenergieübertragung zwischen verschiedenen Untereinheiten eines Proteinmoleküls prinzipiell nachweisbar ist, wurde der Versuch mit dem Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex durchgeführt. Als Donor-Farbstoff wurde hierfür das Dansylaziridin und als Akzeptor das enzymgebundene FAD verwendet. Das FAD bindet als Cofaktor an das aktive Zentrum der Dihydroliponamid-Dehydrogenase-Komponente, während das Dansylaziridin an den Liponsäurerest der Transacetylase gebunden wird. Letzteres konnte mit Hilfe des folgenden Versuches nachgewiesen werden.

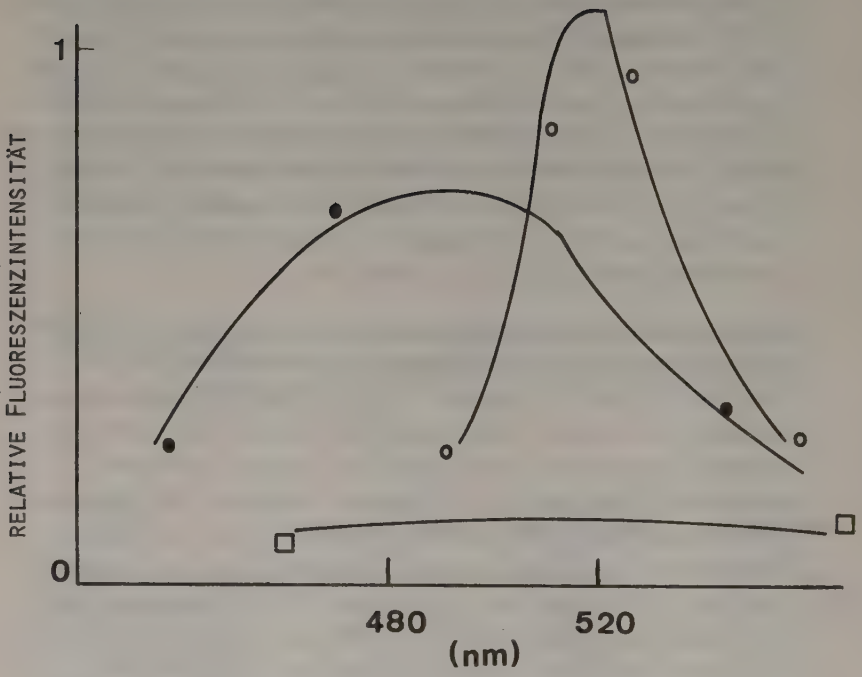

Abb. 23: Emissionsspektrum von dansylaziridin- und fluoresceinmarkiertem Serumalbumin (o) als Probe und dansylaziridinmarkiertem Serumalbumin (●) sowie fluoresceinmarkiertem Serumalbumin (□) als Kontrollen mit jeweils nur einem Farbstoff. Angeregt wurde bei 345 nm. Sensitivität der Kontrolle (●) ist dreimal höher als die der Probe

Zwei getrennte Proben von gereinigtem Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex wurden, wie in den Methoden beschrieben, mit Dansylaziridin inkubiert. Während die Inkubation bei einer der beiden Proben nur in normalem Caliumphosphatpuffer durchgeführt wurde, wurde bei der anderen Probe 4 mM

Pyruvat, 0.5 mM Thiamindiphosphat und 2.2 mM Magnesiumchlorid zugesetzt. Unter diesen Bedingungen wird der, normalerweise in oxidierter Form vorliegende Liponsäurerest der Transacetylase zur Disulfidstufe reduziert. Die Verfolgung der enzymatischen Gesamtreaktion des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes in beiden Proben zeigte, daß in Gegenwart des Puffers alleine die Aktivität nahezu unverändert blieb, während unter Zusatz der Substrate ein 50%iger Aktivitätsverlust zu beobachten war (Tab. 6). In Fluoreszenzmessungen konnte gezeigt werden, daß nur die letztere der beiden Proben Dansylaziridin kovalent gebunden hatte. Daraus kann geschlossen werden, daß dieser Farbstoff nur an die SH-Gruppe der Liponsäure gebunden ist. Damit sollte eine Messung der strahlungslosen Fluoreszenzübertragung zwischen dem kovalent gebundenen Dansylaziridin und dem FAD möglich sein.

Zur Messung der strahlungslosen Fluoreszenzenergieübertragung wurde sowohl die markierte Probe, wie auch, als Kontrolle, ein Komplex, der kein Dansylaziridin gebunden hat, untersucht. In beiden Fällen zeigt sich keinerlei Unterschied, eine Fluoreszenzübertragung konnte nicht nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß der Abstand zwischen den aktiven Zentren der Transacetylase und der Dihydroliponsäureamid-Dehydrogenase mehr als 40 Å beträgt.

Tab. 6: Markierung des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes mit Dansylaziridin in Abwesenheit und Anwesenheit von 4 mM Pyruvat, 0.5 mM Thiamindiphosphat und 2.2 mM $MgCl_2$. Die Gesamtaktivität wurde im NAD-Test bei 37°C gemessen. Die Markierung wurde 2 Stunden bei 4° C durchgeführt.

Enzympräparation	Gesamtaktivität %
Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex (Kontrolle)	100
Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex-Dansylaziridin ohne Zusatz von Substrate	96
Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex-Dansylaziridin mit Zusatz von Substrate	42

3.6 Strukturuntersuchungen der Dihydroliponamid-Transacetylase

3.6.1 Rohrzuckergradienten-Zentrifugation

Bei verschiedenen Präparationen des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes trat wiederholt ein Verlust der Gesamtaktivität auf, der nicht mit einem entsprechenden Verlust einer oder mehrerer Teilaktivitäten des Komplexes einherging. Präparationen dieser Art zeigten als sichtbare Veränderung lediglich eine Spaltung der Transacetylase-Komponente in zwei offensichtlich identische Domäne (7), jedoch konnte kein Abfall der enzymatischen Aktivität dieses Enzyms beobachtet werden. Dieses Phänomen trat vor allem bei Enzymproben auf, die wiederholt eingefroren und aufgetaut worden waren. Tab. 7 zeigt ein Beispiel einer solchen Enzympräparation.

Tab. 7: Vergleich einer nativen und einer spontan inaktivierten Präparation des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes. Die Enzymaktivitäten wurden, wie in den Methoden beschrieben, gemessen.

Enzym	Gesamt-aktivität SA	E2-Aktivität SA	E3-Aktivität SA
PDC (nativ)	1670	90	3500
PDC (inaktiviert)	0	63	3600

Weiterhin wurde eine Präparation eines Partialkomplexes, dem die Pyruvat-Dehydrogenase-Komponente abgespalten wurde, gefunden, die die Fähigkeit verloren hatte, mit zugesetzter, nicht komplexgebundener Pyruvat-Dehydrogenase zu nativen Komplex zu reassoziieren. Diese Reassoziation wird bei Partialkomplexen, die auf diesem Weg gewonnen werden, normalerweise ohne Schwierigkeiten gefunden. Wie die Tab. 8 zeigt, besitzt dieser Partialkomplex noch die beiden verbliebenen Einzelaktivitäten, jedoch erkennt man eine deutliche Abnahme der Aktivität der Transacetylase gegenüber einer Präparation eines anderen Partialkomplexes der parallel isoliert wurde und der weiterhin die Fähigkeit zur Rekonstitution erhalten hat. Während die abgespaltene Pyruvat-Dehydrogenase-Komponente des defekten, wie des noch weiterhin zur Reassoziation befähigten Partialkomplexes ihrerseits voll die Reassoziationsfähigkeit behalten hat, kann der defekte Partialkomplex auch mit Pyruvat-Dehydrogenase-Komponente aus anderen Präparationen nicht reassoziieren.

Tab. 8: Aktivitäten zweier Partialkomplexe im Vergleich mit einem nativen Komplex. Der Partialkomplex RK1 ist mit freier Pyruvat-Dehydrogenase-Komponente reassoziationsfähig, der RK2 nicht. Für die Rekonstitution mit beiden Restkomplexen wurde Pyruvat-Dehydrognease im gleichen Proteinverhältnis (E1:RK) 1:1 zu den Restkomplexen zugesetzt. Aktivitäten wurden gemessen, wie in Methoden beschrieben

Enzyme	Gesamtaktivität bzw. rekonstituierte Gesamtaktivität %	E2-Aktivität SA	E3-Aktivität SA
Komplex (nativ)	100	90	3500
Partialkomplex (RK1)	80	130	6400
Rest-Partial-komplex (RK2)	0	65	6800

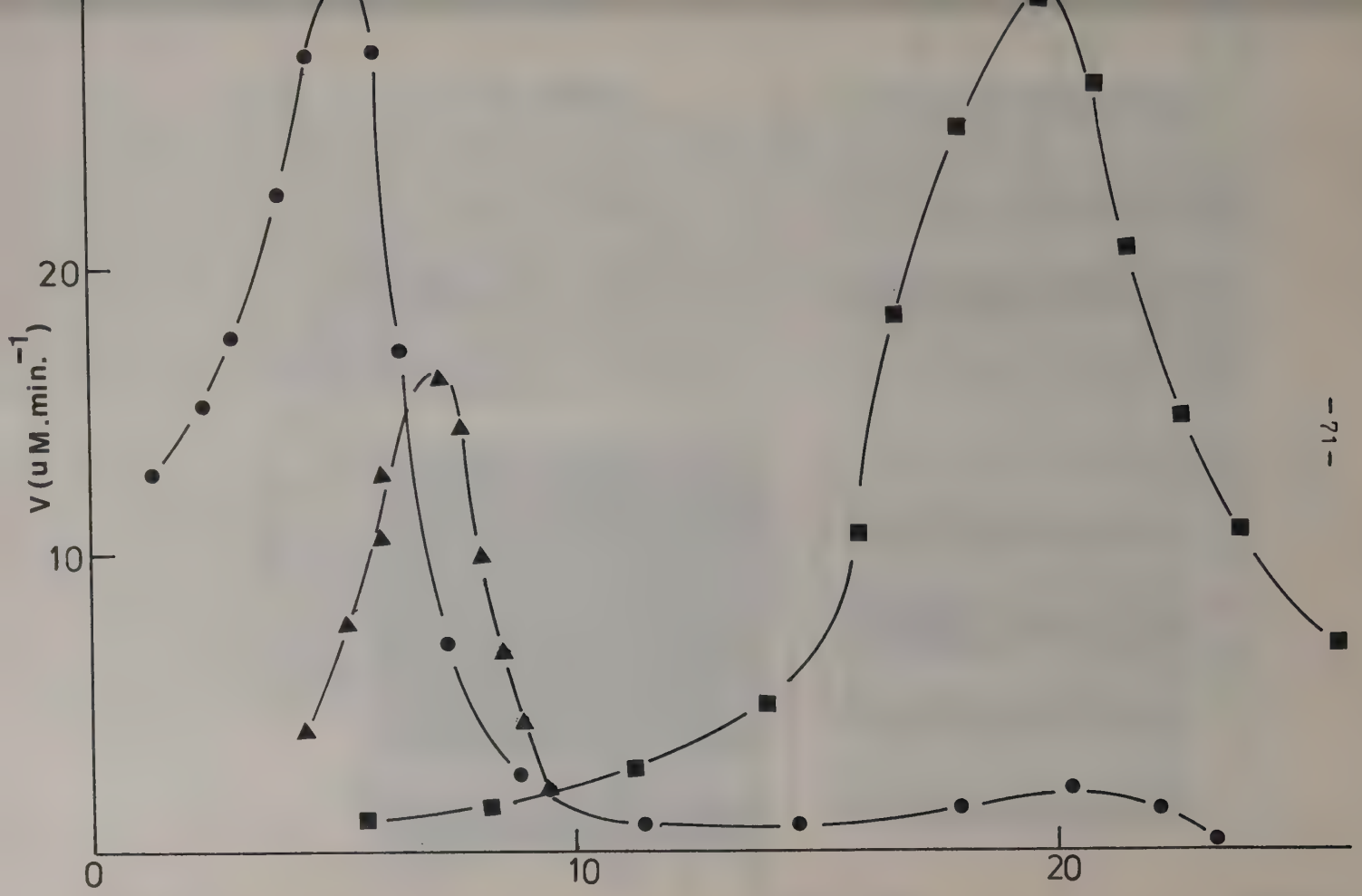

Abb. 24

In einem Rohrzuckergradienten wurde untersucht, ob die Quartärstruktur des defekten Partialkomplexes irgendwie verändert ist. Abb. 24 zeigt, daß dies tatsächlich der Fall ist. Beide Komponenten des Partialkomplexes wandern an verschiedenen Stellen, so daß sie ihrerseits nicht mehr zur Aggregation befähigt sind. Abb. 25 zeigt schließlich noch eine Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese in Gegenwart von Natriumdodycylsulfat des defekten Partialkomplexes im Vergleich zum nativen Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex. Es ist deutlich zu sehen, daß die Polypeptidkette der Transacetylase, die ein Molekulargewicht von 83 000 Daltons besitzt, völlig verschwunden ist, und statt dessen eine Bande der Größe 36 000 neu aufgetreten ist. Ein solcher Zerfall wurde wiederholt beobachtet, auch in nativen Präparationen des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes, die nicht nur ihre volle Quartärstruktur sondern auch ihre enzymatische Aktivität unverändert erhalten hatten. Dieser Zerfall sollte also nicht die Ursache der fehlenden Reassoziationsfähigkeit des Partialkomplexes sein. Darüberhinaus sind jedoch keine Änderungen der Polypeptidketten zu erkennen. Abb. 26 zeigt dagegen zum Vergleich eine Präparation eines Partialkomplexes bei dem die Transacetylasekette noch unverändert ist.

Abb. 24: Rohrzuckergradienten-Zentrifugation einer Präparation eines Restkomplexes, der die Fähigkeit zur Reassoziation verloren hat (RK2) zusammen mit einer aggregationsfähigen Präparation eines Restkomplexes (RK1). Aktivitätsprofile: Dihydroliponamid-Dehydrogenase (■), RK1 (●), RK2 (▲) Katalase (0.3 mg RK1, 0.4 mg RK2 und 4 µg Katalase)

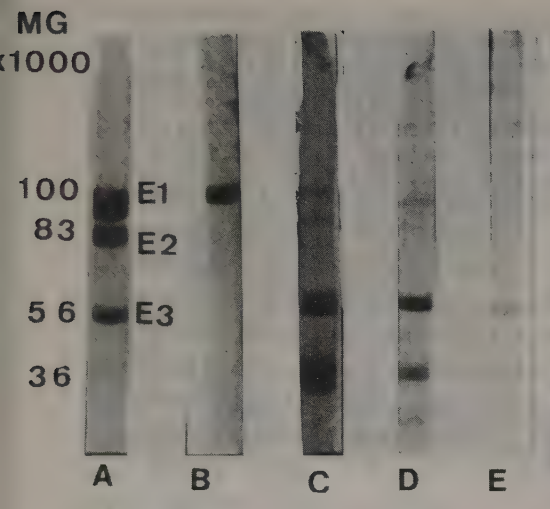

Abb. 25

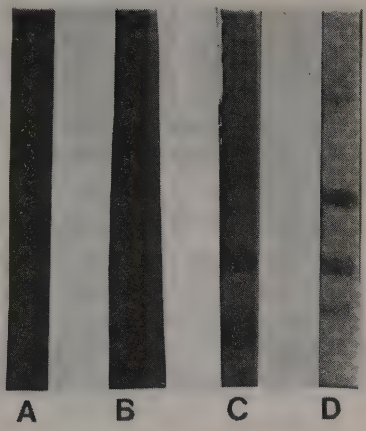

Abb. 26

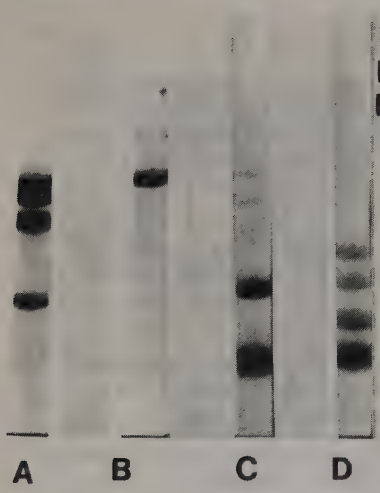

Abb. 28

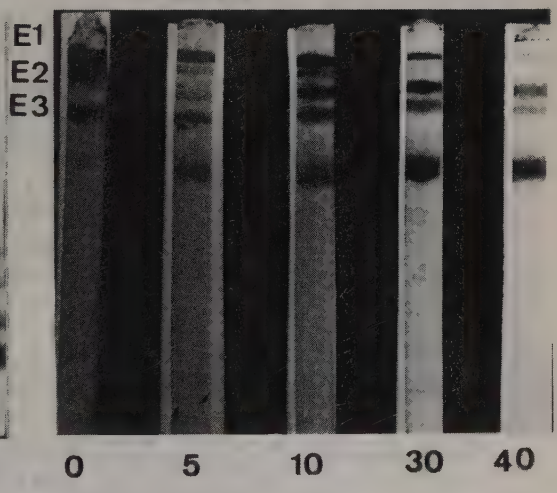

Abb. 30

Abb. 25: Spontaner Zerfall der Transacetylase-Polypeptidkette vom Molekulargewicht 83 000 Daltons in Fragmente der Größe 36 000 Daltons. Die SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese wurde in 10% Acrylamid-Gelen 3.5 Stunden bei Raumtemperatur und 8 mA durchgeführt. A, 30 µg nativer Komplex; B, 10 µg Pyruvat-Dehydrogenase; C, 30 µg Partialkomplex der Mutante ace E2; D, 20 µg des abgetrennten Partialkomplexes (RK1); E, 10 µg des abgetrennten Partialkomplexes (RK2).

Abb. 26: Daten sind wie in Abb. 25. D stellt einen Partialkomplex dar, dessen Transacetylase noch nicht völlig gespalten ist (20 µg wurden davon aufgetragen).

Abb. 28: Thermolysin-Verdauung des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes. Nativer Komplex wurde, wie in Abb. 27 dargestellt, für 60 Minuten mit Thermolysin inkubiert, die Reaktion mit EDTA gestoppt, und ein Aliquot auf die Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat aufgetragen. A, nativer Komplex; B, Pyruvat-Dehydrogenase-Komponente; C, Transacetylase-Dihydroliponamid-Dehydrogenase-Partialkomplex; D, thermolysinverdauter Komplex.

Abb. 30: SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese von thermolysinverdautem Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex. Die Proteaseeinwirkung wurde jeweils nach 0, 5, 10, 30 und 40 Minuten (Reihenfolge der Gele von links nach rechts) mit EDTA gestoppt und Proben auf 10%ige Polyacrylamid-Gele aufgetragen. Die Elektrophorese wurde für 2.5 Stunden durchgeführt.

Um die Ursache des Zerfalls des Partialkomplexes näher zu studieren, wurde die Wirkung exogener Proteasen auf den Komplex und auf seine Untereinheiten im folgenden untersucht.

3.6.2 Proteolytische Teilverdauung

3.6.2.1 Einfluß verschiedener Proteasen auf die Gesamtaktivität des Komplexes

Inkubation des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes mit den Proteasen Thermolysin, Trypsin, Chymotrypsin oder Subtilisin, wie in den Methoden beschrieben, führt innerhalb eines Zeitraums von etwa 40 Minuten zu einem vollständigen Verlust der Gesamtaktivität, während die drei Einzelaktivitäten mehr oder minder unbeeinflußt blieben. Zwischen der Wirkung der vier Proteasen konnte kein grundsätzlicher Unterschied festgestellt werden, nur waren Thermolysin und Trypsin am aktivsten. Tab. 9 zeigt die Wirkung der Proteasen auf die Aktivität des Komplexes und auf seine Komponenten.

Tab. 9: Wirkung von Proteasen auf die Gesamtaktivität des Komplexes und auf die Einzelaktivitäten der Komponenten. Die Aktivitäten sind angegeben in % bezogen auf die Kontrolle (100%).

Inkubationszeit (min)	Gesamtaktivität %	E1-Aktivität %	E2-Aktivität %	E3-Aktivität %
0	100	100	100	100
40	0	80	90	95

3.6.2.2 Proteolytische Verdauung eines Partialkomplexes aus Transacetylase und Dihydroliponamid-Dehydrogenase

Da, wie die vorhergehenden Versuche gezeigt haben ein grundsätzlicher Unterschied zwischen den verschiedenen veränderten Proteasen nicht zu erkennen ist, wurden die nachfolgenden Experimente mit nur einer der Proteasen, nämlich mit Thermolysin durchgeführt. Zunächst wurde dabei der Einfluß der Protease auf die Rekonstitution eines Partialkomplexes aus Transacetylase und Dihydroliponamid-Dehydrogenase mit der Pyruvat-Dehydrogenase-Komponente untersucht. Die Inkubation dieses Partialkomplexes mit Thermolysin führt zu einem Verlust seiner Fähigkeit, mit der fehlenden Komponente zum nativen Komplex zu reaggregieren. Dagegen behielt eine über den gleichen Zeitraum hinweg mit Thermolysin inkubierte Pyruvat-Dehydrogenase-Komponente zu 50% noch die Fähigkeit zu einem aktiven Komplex zu reaggregieren, wenn sie mit unverdautem Partialkomplex gemischt wurde. Es zeigt sich, daß der Verlust der Komplexbindungsfähigkeit durch einen Effekt der Transacetylase bedingt ist.

3.6.2.3 Untersuchung der Quartärstruktur und proteolytisch verdautem Komplex

Um die Wirkung der proteolytischen Verdauung auf die enzymatische Aktivität und die Struktur des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes und seiner drei Einzelkomponenten genauer zu analysieren, wurde zunächst ein Versuch unternommen, bei dem ein nativer Komplex mit Thermolysin inkubiert und zu bestimmten Zeitabständen Proben entnommen und auf ihre enzymatische Aktivität hin untersucht wurden. Abb. 27 zeigt, daß in einem raschen experimentellen Prozeß die Gesamtaktivität innerhalb von 10 Minuten völlig auf 0 abfällt, während

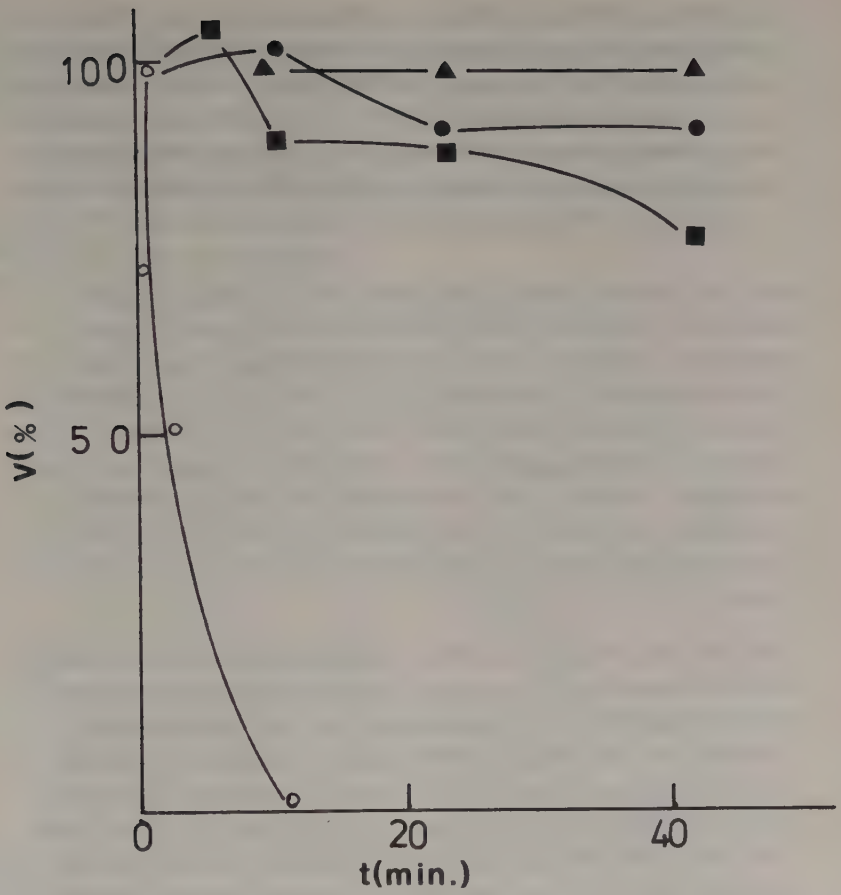

Abb. 27: Aktivitätsabhängigkeit des Komplexes und seiner Untereinheiten von der Inkubationszeit mit Thermolysin. Aktivitätsprofile: (○) Gesamtaktivität, (■) Pyruvat-Dehydrogenase, (●) Transacetylase, (▲) Dihydroliponamid-Dehydrogenase.

die Teilaktivitäten nahezu unverändert bleiben. Allein die Pyruvat-Dehydrogenase-Komponente zeigt einen geringen Aktivitätsverlust im Zeitraum von 40 Minuten. Eine anfängliche leichte Aktivierung aller drei Einzelaktivitäten nach 10 Minuten wurde wiederholt beobachtet und könnte möglicherweise durch die Entkopplung der Einzelaktivitäten infolge des Verlusts der Gesamtaktivität zustande kommen.

Nach 60 Minuten wurde eine Probe des verdauten Enzymkomplexes entnommen, die proteolytische Reaktion mit EDTA gestoppt, und das Enzym auf die SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese aufgetragen. Wie in Abb. 28 D zu sehen ist, ist die Transacetylase vollständig in das kleinere 36 000 Daltons Fragment zerfallen. Ferner beobachtet man noch einen Zerfall der Pyruvat-Dehydrogenase-Komponente in Banden der Größe 65 und 40 000 Daltons. Die Dihydroliponamid-Dehydrogenase-Komponente dagegen bleibt unverändert.

Eine weitere Probe des für 60 Minuten mit thermolysinverdauten Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes wurde auf einen Rohrzuckergradienten aufgetragen und für dreieinhalb Stunden bei 100 000 g zentrifugiert. Es ist in Abb, 29 deutlich zu erkennen, daß alle drei Einzelaktivitäten in einer Bande wandern, die wesentlich schwerer ist als die als Vergleichsprotein eingesetzte Katalase und die, wie ein Vergleich mit nativem Komplex zeigt, nur geringfügig leichter ist als der unveränderte Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex. Einzig die Dihydroliponamid-Dehydrogenase-Komponente ist zu einem gewissen Prozentsatz aus der Komplexstruktur losgelöst und wandert als dimeres Proteinmolekül vor der Katalase. Die Fraktionen, die Transacetylaseaktivität enthielten, wurden vereinigt, gegen 0.05 M Caliumphosphatpuffer pH 7 dialysiert und auf die Aktivitäten der enzymatischen Komponenten hin überprüft. Wie

man in Tab. 10 sieht, sind die spezifischen Aktivitäten der Pyruvat-Dehydrogenase und der Transacetylase angestiegen, während die der Dihydroliponamid-Dehydrogenase-Komponente erniedrigt ist. Dies ist verständlich, da letztere in dem Komplex reduziert ist, während anteilig die beiden anderen Komponenten stärker vertreten sind. In jedem Fall findet sich kein Aktivitätsverlust von einer der drei Komponenten.

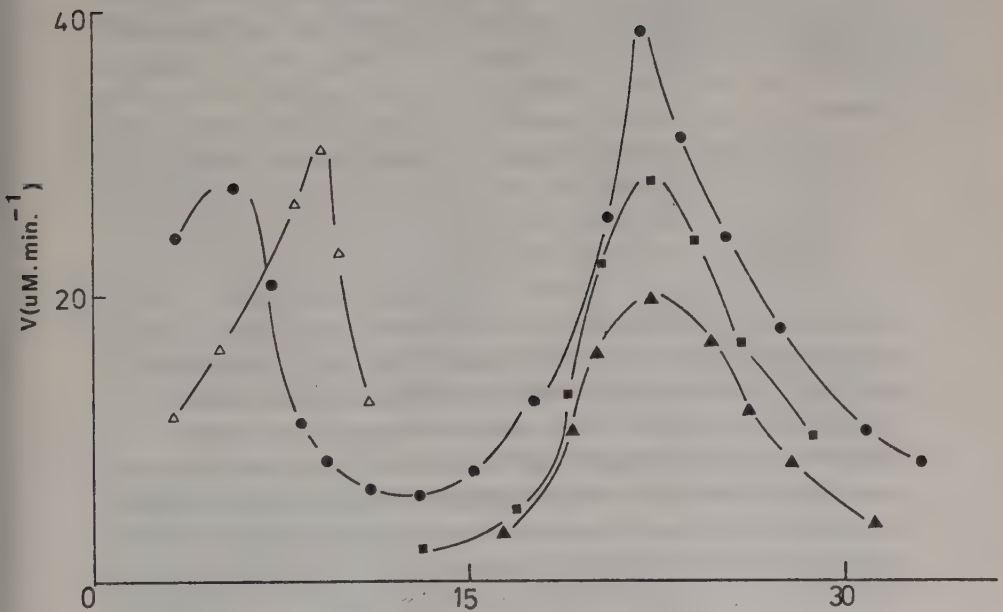

Abb.29

Abb. 29: Rohrzucker-Gradienten-Zentrifugation von 0.5 mg thermolysinverdautem Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex. Aktivitätsprofile von E3- (●), E2- (■), E1- (▲)-Komponenten, Katalase (△).

Tab. 10: Enzymatische Aktivitäten eines thermolysinverdauten Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes. Der Komplex wurde, wie oben beschrieben, für 60 Minuten mit Thermolysin verdaut, in dem in Abb. 30 gezeigten Zuckergradienten zentrifugiert und die transacetylasehaltigen Fraktionen vereinigt und gegen 0.05 molaren Caliumphosphatpuffer pH 7 dialysiert.

	Gesamtaktivität %	E1-Aktivität %	E2-Aktivität %	E3-Aktivität %
Kontrolle	100	100	100	100
Probe	0	130	130	95

In Abb. 30 ist schließlich mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese der zeitliche Verlauf der Proteolyse verfolgt. Der Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex wurde mit Thermolysin inkubiert, die Reaktion zu den angegebenen Zeiten mit EDTA gestoppt und Proben auf Elektrophoreseröhrchen aufgetragen. Es fällt ein rasches Verschwinden der Polypeptidkette der Transacetylase und ein simultanes Auftreten des 36 000 Daltons-Fragments auf, dieser Prozeß erfolgt gleichzeitig oder eher schneller wie der Verlust der Gesamtaktivität durch die Proteaseeinwirkung. Nach längerer

Zeit erkennt man auch einen Zerfall der Pyruvat-Dehydrogenase-Komponente, der jedoch deutlich nach dem Verlust der Gesamtaktivität eintritt.

Es ist dabei zu sehen, daß der Verlust der Transacetylase-aktivität nicht einher geht mit dem Zerfall des nativen Komplexes und daß als einzige mögliche Ursache der Zerfall der Transacetylase-Komponente in Frage käme. Jedoch konnten bereits früher Komplexpräparationen gefunden werden, bei denen diese Komponente in Fragmente zerfallen war, eine Beeinflussung der Gesamtaktivität jedoch nicht festgestellt

wurde. Umgekehrt ist die Spaltung der Transacetylase nicht Ursache des Zerfalls des Komplexes in die Untereinheiten, obwohl, wie oben gezeigt, der nicht reassoziationsfähige Komplex diese Spaltung als einzig sichtbares Zeichen eines proteolytischen Eingriffs aufweisen. Der Erhalt der Quartärstruktur des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes unter den Bedingungen der Thermolysinverdauung konnte auch an Hand elektronenmikroskopischer Aufnahmen gezeigt werden. Dies ist in Abb.31b zu sehen. Längere Verdauung führt jedoch auch hier zu einem Zerfall in die Komponenten, wie dies in Abb. 31d am Beispiel eines für 4 Stunden mit Chymotrypsin behandelten Komplexes gezeigt ist. Hier fällt auf, daß die Würfelstruktur der Transacetylase selbst unverändert bleibt. Im Vergleich dazu zeigt der oben beschriebene spontan zerfallene Enzymkomplex ebenfalls eine weitgehende Disaggregation. Abb. 31e-g zeigt schließlich noch eine Reaggregation eines Transacetylase-Dihydroliponamid-Dehydrogenase-Partialkomplexes mit der Pyruvat-Dehydrogenase-Komponente.

Abb. 31: Elektronenmikroskopische Aufnahmen verschiedener Präparationen des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes. A, nativer Komplex; B, für 40 Minuten mit Thermolysin verdauter Komplex; C, spontan desaktivierte Komplex-Präparation; D, für 4 Stunden mit Chymotrypsin verdauter Komplex; E, Transacetylase-Dihydroliponamid-Dehydrogenase-Partialkomplex; F, mit Pyruvat-Dehydrogenase-Komponente zu 10% gesättigter Partialkomplex; G, mit Pyruvat-Dehydrogenase-Komponente voll gesättigter Partialkomplex. Alle Präparate wurden mit Phosphowolfram-Säure angefärbt, einmal mit Wasser gewaschen und bei 40 000-facher Vergrößerung im Elmiskop 2 A (Siemens) fotographiert. Durch die dreifache Vergrößerung der Aufnahmen resultiert eine insgesamt 120 000-fache Vergrößerung.

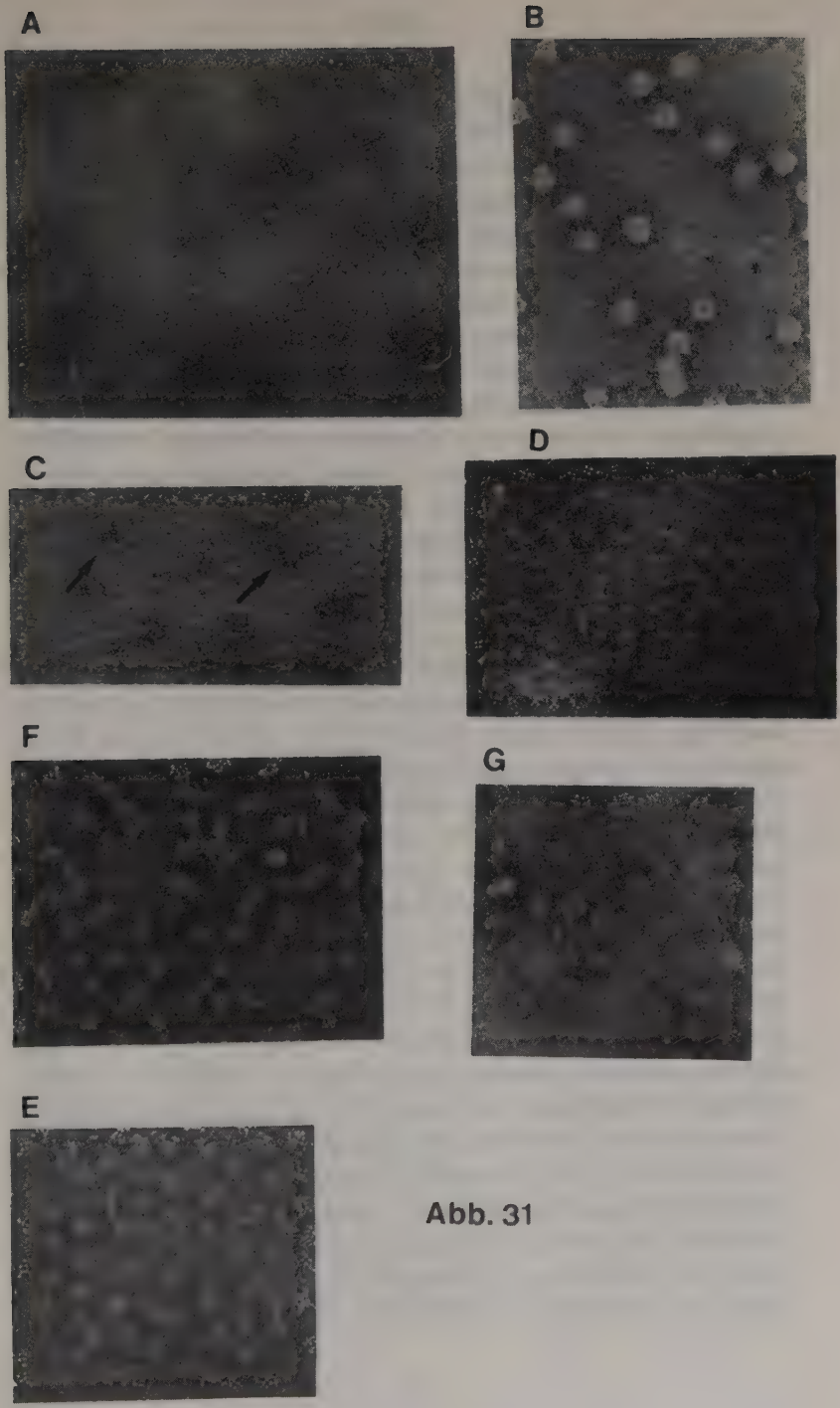

Abb. 31

4. DISKUSSION

Zum genauen Verständnis der verschiedenen Regulationsmechanismen, die auf den Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex einwirken, ist es von Vorteil, die einzelnen Enzymeinheiten isoliert zu betrachten und ihre jeweilige Rolle im Gesamtkomplex zu studieren. Um dabei die möglicherweise sehr feinen Wechselwirkungen zwischen den Untereinheiten zu erhalten, sollten die Isolierungsmethoden sehr schonend sein. Hier bietet sich der Weg an, die einzelnen Komponenten in nicht komplexgebundener Form aus Defektmutanten zu isolieren, denen jeweils eine oder zwei der anderen Komponenten fehlen. Dieser Weg führte bei der Pyruvat-Dehydrogenase-Komponente, wie auch bei der Dihydroliponamid-Dehydrogenase-Komponente zur Isolierung sehr sauberer, aktiver Enzymkomponenten (78).

Im Falle der hier zu behandelnden Dihydroliponamid-Transacetylase ist dieses Problem wesentlich schwieriger zu lösen. Zum einen ist hier eine Doppelmutante erforderlich, der die beiden anderen Enzymkomponenten fehlen, da gezeigt werden konnte, daß die Transacetylase die Komplexbindung aller Untereinheiten vermittelt (3). Zum anderen sind Mutanten im Strukturgen der Dihydroliponamid-Dehydrogenase schwer zu isolieren. Frühere eingehende Untersuchungen von der Arbeitsgruppe von U. Henning ergaben bei Selektion aus Acetatmangelmutanten nur Defekte im Pyruvat-Dehydrogenase- bzw. Transacetylase-Gen. Selbst Selektionen auf simultane Acetat-Succinat-Defekte, wie sie gefordert werden müßten, wenn die Dihydroliponamid-Dehydrogenase-Komponente sowohl im Pyruvat-Dehydrogenase- wie auch α-Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplex vorhanden ist, ergaben nur Mutanten mit einem Defekt in der Liponsäure-Biosynthese. Erst sehr genaue Untersuchungen unter Anwendung neuer Selektionsmethoden von Guest (32) ergaben zwar in sehr geringer Zahl neben den genannten liponsäuredefiziente Mutanten die gewünschten Dehydrogenase-Mutanten. Diese erwiesen sich,

wie auch hier im Labor ausgetestet werden konnte, als nicht stabil, so daß sie als Ausgangsstämme für größere Enzymreinigungen nicht in Frage kamen. Die genaue Kartierung des Gens der Dihydroliponamid-Dehydrogenase in der Gegend des ace-Locuses wies jedoch einen möglichen Weg, stabilere Mutanten zu erhalten durch die Anwendung gezielter Mutationsmethoden. Dies erfolgt unter Verwendung bestimmter genetischer Merkmale in diesem Bereich des Chromosoms von Escherichia coli, wie des Gens für die Biosynthese der Pantothensäure. Es besteht so die Möglichkeit, längere Deletionen einzuführen und somit die Reversion zum Wildtypcharakter auszuschließen. Eine zweite Möglichkeit ist die Einführung stark mutierter Genstücke um diesen Bereich des Chromosoms mit Hilfe transduzierter Phagen. Beide Methoden führten jedoch nicht zum gewünschten Erfolg. Zwar war es möglich, einfache Acetatmutanten nachzuweisen, die in den Genen der Pyruvat-Dehydrogenase, wie auch der Transacetylase defekt waren, jedoch die gesuchte Mutation der Dihydroliponamid-Dehydrogenase konnte auf diese Weise nicht gefunden werden. Dies, zusammen mit der bereits von anderen Arbeitsgruppen beschriebenen schwierigen Selektion von Mutanten in diesem Genbereich, mag darauf hindeuten, daß es sich hierbei um einen etwas komplizierteren genetischen Hintergrund handelt, als es bisher angenommen wird. Eine Erklärungsmöglichkeit könnte darin bestehen, daß, obwohl die Dihydroliponamid-Dehydrogenase-Komponente in den beiden Enzymkomplexen α-Ketoglutarat-Dehydrogenase und Pyruvat-Dehydrogenase voll austauschbar ist, trotzdem zwei Strukturgene auf verschiedenen Stellen des Chromosoms vorhanden sind. Durch die Austauschbarkeit der Enzyme beider Strukturgene könnte so ein Defekt an einem der beiden Gene übersehen werden, so daß möglicherweise Guest bei seiner Kartierung des Strukturgens dieses Enzyms bereits von einer Defektmutante ausgegangen ist und nurmehr ein einziges Gen für beide Enzyme finden konnte. Läge dieses zweite Gen auf einem ganz anderen Chromosomenabschnitt,

so würden die hier verwendeten Selektionsmethoden bei einem Stamm, der noch beide Gene unbeschädigt erhalten hat, nicht zum Ziel führen. In jedem Fall hätte eine eingehende Analyse des genetischen Hintergrunds dieses Enzyms den Rahmen der vorliegenden Arbeit, die sich insbesondere mit der Charakterisierung der Transacetylase-Komponente aus dem Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex beschäftigen sollte, weit überschritten. Es schien daher an dieser Stelle geboten, auf eine weitere Verfolgung dieses Problems zu verzichten und das Enzym aus dem gereinigten nativen Komplex durch Abspaltung zu gewinnen.

Zur Abtrennung der Transacetylase-Komponente aus dem Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex wurde die Methode von Koike et al. (12) verwendet, die jedoch etwas modifiziert werden mußte. Bei dieser Methode erhält man zunächst durch Abspaltung der Pyruvat-Dehydrogenase-Komponente im alkalischen Milieu einen Partialkomplex aus Transacetylase und Dihydroliponamid-Dehydrogenase. Letzteres Enzym wird in einem zweiten Trennungsschritt in Gegenwart von 4 M Harnstoff abgespalten. Beide Trennschritte führen zu einer deutlichen Desaktivierung der beteiligten Enzymkomponenten, insbesondere erwies sich der Harnstoffschritt als problematisch. Je länger der auf der Calciumphosphatsäule aufgetragenen Partialkomplex mit Harnstoff eluiert wurde, desto mehr wanderten Anteile der Dihydroliponamid-Dehydrogenase-Fraktion in die Bande der Transacetylase. Es erwies sich daher als vorteilhaft, unter Inkaufnahme geringerer Ausbeuten die Elution rasch durchzuführen. Dadurch konnte auch die irreversible Inaktivierung der Transacetylase, bedingt durch den langen Kontakt mit dem Harnstoff, stark vermindert werden. Trotzdem ist diese Methode nicht sehr schonend für die Transacetylasekomponente. Dieses Enzym erleidet eine Aktivitätseinbuße von bis zu 60%, so daß man es nicht unbedingt als Modell einer nativen Einzelkomponente ansehen kann. Die vergleichenden Versuche der kinetischen Eigenschaften der isolierten mit der

komplexgebundenen Transacetylasekomponente zeigten aber weitgehend Obereinstimmung, so daß eine grundlegende Veränderung des Enzyms durch die Abspaltung vom Komplex offensichtlich nicht stattgefunden hat. Sowohl hinsichtlich des pH-Optimums wie auch des Verhaltens gegenüber der Temperatur zeigen beide Enzyme hier nahezu übereinstimmendes Verhalten, auch die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Konzentration des Dihydroliponsäureamids ist bei beiden Enzympräparationen identisch. Man erhält den gleichen sigmoiden Kurvenverlauf, wie auch einen übereinstimmenden $S_{0.5}$-Wert.

Der bereits früher für das komplexgebundene Teilenzym beschriebene sigmoide Kurvenverlauf (43) ist bemerkenswert, da die hier getestete Transacetylase-Reaktion prinzipiell unphysiologisch ist. Während normalerweise die Obertragung des Acetylrests über die enzymgebundene Liponsäure zum Acetyl-CoA verläuft, wird hier die Rückreaktion zum Acetyl-CoA auf die der Lösung zugesetzten Dihydroliponsäure gemessen. Dabei scheint die enzymgebundene Liponsäure an der Reaktion nicht teilzunehmen. Freie Liponsäure kann zwar an das Enzym binden, dies wahrscheinlich jedoch mehr auf Grund ihrer lipophilen Natur und weniger wegen des Vorhandenseins einer spezifischen Bindungsstelle am Enzym. Es ist daher nicht ohne weiteres verständlich, welche Rolle die hier beobachtete kooperative Bindung der unter physiologischen Bedingungen nicht als Substrat der Transacetylase fungierenden Dihydroliponsäure spielt.

Möglicherweise ist die sigmoide Sättigungskinetik ein Hinweis auf Wechselwirkungen zwischen den Transacetylaseuntereinheiten, die jedoch unter physiologischen Bedingungen durch andere Faktoren beeinflußt werden. Das hier beobachtete übereinstimmende kooperative Verhalten der komplexgebundenen wie auch der isolierten Transacetylasekomponente zeigt, daß die anderen beiden Enzymkomponenten keinen Einfluß darauf haben. Insbesondere ist damit gezeigt, daß der kooperative Effekt des Pyruvats

auf die Pyruvat-Dehydrogenase-Komponente (43) völlig unabhängig von dem der Dihydroliponsäure auf die Transacetylase ist.

Die Reassoziation der isolierten Transacetylasekomponente mit den beiden anderen Enzymkomponenten führt, wie bereits von Reed et al. (1) gezeigt, zur Wiederherstellung des nativen Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes, der in seiner enzymatischen Aktivität dem ungespaltenen weitgehend gleich ist. Die Kinetik der Reassoziation könnte jedoch Rückschlüsse zulassen auf Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen Untereinheiten des Komplexes. In dieser Arbeit wurden daher die Wechselwirkungen der Dihydroliponamid-Transacetylase-Komponente mit der Pyruvat-Dehydrogenase-Komponente eingehender studiert. Die Pyruvat-Dehydrogenase selbst ist offensichtlich die regulatorische Einheit des Enzymkomplexes, an dem nahezu alle regulatorischen Metaboliten angreifen, die die enzymatische Aktivität des Komplexes beeinflussen (43). Da die Pyruvat-Dehydrogenase-Komponente über den Kern der Transacetylase an den Komplex gebunden ist, wäre anzunehmen, daß die Wechselwirkungen dieser Komponente über die Transacetylase vermittelt werden. Die kinetische Reaktion konnte hier in zwei verschiedenen Weisen verfolgt werden, nämlich durch die Wiederherstellung der enzymatischen Aktivität des Gesamtkomplexes, wie durch die Analyse der nachbarschaftlichen Bindung der neu hinzukommenden Komponenten. Letzteres war möglich durch die Beobachtung der strahlungslosen Fluoreszenzenergieübertragung.

Die Reaktivierung des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes durch Mischen der Pyruvat-Dehydrogenase-Komponente mit einem Partialkomplex aus Transacetylase und Dihydroliponamid-Dehydrogenase erwies sich als ein zeitabhängiger Prozeß von der Dauer mehrerer Sekunden bis einiger Minuten. Für einen Komplex mit einem solchen komplizierten Aufbau wäre es durchaus verständlich, daß die Reaktivierung ein über mehrere Stufen verlaufender komplizierter Prozeß ist,

der eine längere Zeitdauer beansprucht. Wenn es sich jedoch bei den geschwindigkeitsbestimmten Vorgängen um reine Umorientierungs- und Isomerisierungsprozesse innerhalb des Komplexes handeln würde, müßte man dafür eine Reaktion erster Ordnung erwarten. Die Ergebnisse weisen jedoch eindeutig auf eine Reaktion zweiter Ordnung hin, so daß die beobachtete Verzögerungsphase tatsächlich ein Ausdruck des Bindungsprozesses ist. Dieser Bindungsvorgang ist trotzdem relativ rasch, wie die Geschwindigkeitskonstante $k = 3.5 \times 10^6$ sec^{-1} M^{-1} zeigt. Das tatsächlich beobachtete langsame Anlaufen der Reaktivierung des Komplexes ist zu erklären durch die sehr geringen eingesetzten Mengen der beiden Enzymkomponenten als Reaktionspartner, die, da nur Enzymreaktionen beobachtet werden, in katalytischen Mengen vorgelegt wurden. Da auf diese Weise gezeigt werden konnte, daß der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Reaktivierung der Bindungsschritt ist, erschien es gerechtfertigt, das Ausmaß der Reaktivierung direkt als Maß der Herstellung einer nativen Komplexstruktur zu nehmen.

Die Abhängigkeit der Reaktivierung von der Konzentration der Pyruvat-Dehydrogenase-Komponente zeigt scheinbar einen hyperbolen Verlauf, wie er auch bereits von Perham und Mitarbeiter (3) beschrieben wurde. Eine genauere Analyse des geringen Konzentrationsbereichs der Bindung der Pyruvat-Dehydrogenase-Komponente zeigt jedoch eine Abweichung in der Art einer "negativen Kooperativität". Dies wird besonders in der linearisierten Darstellung nach Stockell deutlich.

Auch die Methode der Bestimmung der direkten nachbarschaftlichen Bindung gibt ein solches Ergebnis. Durch das Messen der strahlungslosen Fluoreszenzenergieübertragung zwischen zwei Farbstoffen, die jeweils an verschiedene Enzymkomponenten gebunden waren, hatte man einen sehr empfindlichen Detektor zum Bestimmen nachbarschaftlicher Bindungen. Mit dieser Methode ist es nur möglich, Abstände zu erkennen, die geringer sind als 60 Å, so daß davon aus-

gegangen werden konnte, daß nur unmittelbar aneinander stoßende Untereinheiten erkannt werden können. Um die Energieübertragung wahrscheinlicher zu machen, war es nötig, eine größere Anzahl von Farbstoffmolekülen pro Enzymuntereinheit binden zu lassen, so daß unspezifisch an Aminogruppen bindende Fluoreszenzfarbstoffe hierfür geeignet schienen. Am geeignetsten erwiesen sich dabei das Fluorescamin und das Fluorescein als Donor- und Akzeptorpaar. Die unterschiedliche Fluoreszenzintensität beider Farbstoffe erforderte jedoch eine ungleich intensive Behandlung der Komponenten mit diesen Verbindungen. Dies führte dazu, daß im Falle des Fluorescamins eine deutliche Inaktivierung des Enzyms nicht vermieden werden konnte, während die Markierung mit Fluorescein zu einer nur geringfügigen Beeinträchtigung der Aktivität des Enzyms führte. In beiden Fällen blieb die Bindungsfähigkeit der markierten Enzymkomponenten an die Transacetylase bzw. den Restkomplex voll erhalten und zeigte die gleiche Charakteristik wie die der unbehandelten Pyruvat-Dehydrogenase-Komponente. Es konnte also davon ausgegangen werden, daß die Bindungseigenschaften nicht wesentlich beeinträchtigt werden. Da ferner die stärker inaktivierte, fluorescaminmarkierte Pyruvat-Dehydrogenase-Komponeten selbst nur als Indikator der Bindung verwendet wurde, der eigentliche Bindungsprozeß aber mit der wenig inaktivierten fluoresceinmarkierten Enzymkomponente gemessen wurde, kann man eine Beeinträchtigung des Bindungsverhaltens zu dem Farbstoff bei den hier gemachten Versuchen weitgehend ausschließen. Dies bestätigen auch die übereinstimmenden Ergebnisse dieser Versuche mit den Reaktivierungsversuchen.

Da bei dieser Methode nicht das Bindungsverhalten aller Pyruvat-Dehydrogenase-Untereinheiten an dem Partialkomplex studiert wird, sondern nur das derjenigen, die in unmittelbarer Nachbarschaft an eine bereits vorhandene Komponente binden, haben die zu erwartenden Bindungskurven eine andere Form als bei normalen Bindungsversuchen. Ein völlig unbe-

einflußtes Bindungsverhalten der Untereinheiten gibt zwar auch hier einen hyperbolen Kurvenverlauf. Eine positive Kooperativität gibt gibt sich dagegen in einem steileren Anstieg und einer früheren Sättigung zu erkennen, da hier die nachbarschaftliche gegenüber der isolierten Bindung bevorzugt ist und daher die benachbarten Bindungsstellen rascher abgesättigt werden als der Vollsättigung des Enzymkomplexes entspricht. Negativ kooperatives Verhalten zeigt demgegenüber eine sigmoide Charakteristik, da die Absättigung der nachbarschaftlichen Bindungsstellen verzögert wird und zunächst möglichst alle isolierten Bindungsstellen besetzt werden. Erst bei höherer Konzentration können auch direkt aneinanderstoßende Untereinheiten gebunden werden. Die Sättigungskurven der hier beschriebenen Art konnten mit Hilfe einer Monte-Carlo-Simultation bestätigt werden (79) (Abb. 32).

Das hier beobachtete negative kooperative Verhalten der Bindung der Pyruvat-Dehydrogenase-Komponente an den Transacetylase-Dihydroliponamid-Dehydrogenase-Partialkomplex widerspricht scheinbar der erwarteten positiven Kooperativität, die bei der Bindung des Pyruvats an die Pyruvat-Dehydrogenase-Komponente, sowie des Dihydroliponamids an die Transacetylase beobachtet wurde. Ein positives Sättigungsverhalten der Substrate des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes muß jedoch nicht ein gleichartiges Bindungsverhalten der Komponenten beim Aufbau dieses Komplexes bedingen. Gerade das antikooperative Verhalten dieser Bindung kann als Hinweis einer Wechselwirkung zwischen den Untereinheiten auf dem nativen Komplex gewertet werden, da man sich leicht vorstellen kann, daß in Form eines "induced fit"-Vorgangs an den Kontaktstellen der Untereinheiten erst bei Berührung eine die Wechselwirkung ausführende Brücke gebildet werden muß. Die dafür nötige höhere Energie macht sich in einer schwereren nachbarschaftlichen Bindung erkennbar, als der reinen isolierten Bindung an die Transacetylase entspricht.

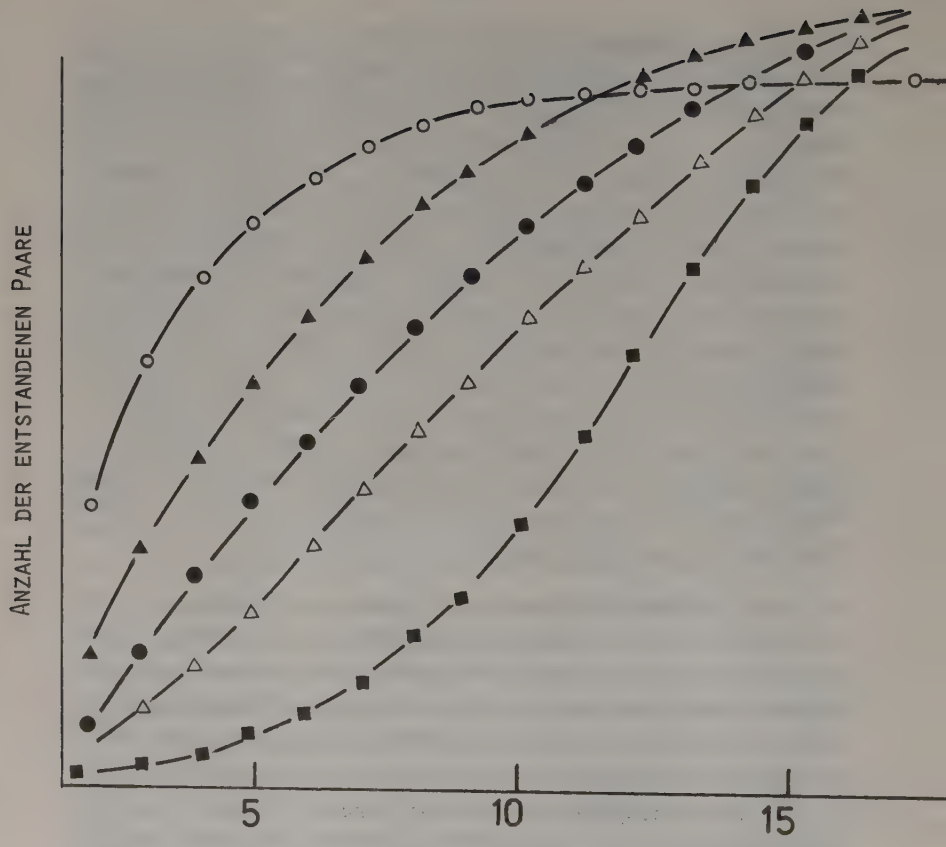

Abb. 32: Monte-Carlo-Simulation der Bindung der Pyruvat-Dehydrogenase-Komponente an den Restkomplex. Verschiedene Mechanismen sind hier dargestellt. Zu einem Molekül Restkomplex wurde ein Molekül der freien Pyruvat-Dehydrogenase-Komponente (Donor) zugegeben. Die akzeptormarkierte Pyruvat-Dehydrogenase-Komponente wurde stufenweise zugegeben und die Anzahl der mit dem Donor entstandenen Paare nach jeder Zugabe gezählt. Die relative Wahrscheinlichkeit, mit der eine entfernte freie Bindungsstelle besetzt werden kann, wurde als einheitlich betrachtet, die der benachbarten Bindungsstellen als 1, (●) (normale Bindung); 2, (▲); 20, (○) (kooperativ); 0.5, (△); 0.1, (■) (antikooperativ).

Die Methode der Bestimmung der direkten Nachbarschaft zwischen Proteinkomponenten mit Hilfe der Messung der strahlungslosen Fluoreszenzenergieübertragung, die jetzt zum ersten Mal auf die Bestimmung des Bindungsverhaltens der Proteinkomponeten angewandt wurde, läßt sich sinngemäß auch auf vergleichbare andere biologische Systeme übertragen, wie beispielsweise das Studium der Bindung von Proteinen an Membranen.

Das Studium der Struktur der Dihydroliponamid-Transacetylase ergab einen noch komplizierteren Aufbau als bisher angenommen wurde. Aufgrund einer Vielzahl von Untersuchungen mehrerer Arbeitsgruppen kristallisierte sich zunächst ein Aufbau dieser Enzym-Komponente aus zwei offensichtlich ähnlichen oder möglicherweise sogar identischen Domänen ab (80). Das Auffinden von zumindest zwei Dihydroliponamid-Resten pro Transacetylase-Polypeptidkette durch Perham et al. (27), legt die Möglichkeit nahe, daß eine Polypeptidkette zwei Liponsäurereste trägt, die gleiche Spezifität, oder aber zwei verschiedene Aktivitäten besitzen könnten, wobei die eine Komponente eine reduktive Acetylierung und die andere eine Transacetylierung bewirken könnte. Eine solche Transacetylierung über mehrere Liponsäurereste des gleichen Komplexmoleküls hinweg konnte durch Arbeiten von Reed (9) sowie von Perham (11) nahegelegt werden, die unabhängig voneinander zeigen konnten, daß ein und derselbe Acetylrest über zumindest die Hälfte des Komplexmoleküls weitergereicht werden kann. Es kann dabei jedoch bis heute noch nicht eindeutig unterschieden werden, ob für diese Transacetylierungsreaktion andere Liponsäurereste verantwortlich sind, wie für die reduktive Acetylierung oder ob die gleichen Reste beide Funktionen übernehmen können. Übereinstimmend wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen die Spaltung der Transacetylase-Komponente in Fragmente der Größe von etwa 36 000 Daltons nachgewiesen. Diese Fragmente behalten noch voll ihre Transacetylase-Aktivität und halten auch noch die Komplexstruktur des

Enzyms aufrecht. Da enzymatisch aktive Präparationen des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes mit vollständig gespaltener Transacetylase-Komponente gefunden wurden, scheint es zunächst, daß durch die Spaltung keinerlei essentielle Funktionen des Enzymkomplexes betroffen wurden. Es liegt hier die Vermutung nahe, daß durch Fusion zweier benachbartet identischer oder zumindest sehr ähnlicher Gene ein Tandemmolekül aus zwei ähnlichen Domänen entstanden ist (81).

Die hier angestellten Untersuchungen weisen jedoch darauf hin, daß zu den genannten enzymatisch aktiven Regionen, offenbar räumlich getrennt, Bereiche auf der Polypeptidkette der Transacetylase lokalisiert sein müssen, die die Bindung zu den anderen beiden Enzymkomponenten, der Pyruvat-Dehydrogenase und der Dihydroliponamid-Dehydrogenase unter Ausbildung der Komplexstruktur vermittelt. Ältere Präparationen des Enzymkomplexes zeigen wieder einen vollständigen Aktivitätsverlust in der Gesamtreaktion des Komplexes, bei praktisch unverändertem Erhalt der Partialaktivitäten aller drei Enzymkomponenten. Auch die Bindung dieser Komponenten an den Komplex scheint, wie die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen, unverändert zu sein. Die Aktivität des Gesamtenzyms erfordert also nicht nur das Vorhandensein der drei Teilreaktionen in einer komplexen Struktur. Da in den genannten Enzympräparationen außer der Spaltung der Transacetylase in das 36 000 Dalton-Fragment keine nachweisbare Veränderung beobachtet werden kann, muß angenommen werden, daß die Spaltung als solche für die Desaktivierung verantwortlich ist. Da das Molekulargewicht der nativen Transacetylase-Kette (83 000 Daltons) um mehr als 10 000 Daltons größer ist als zwei hintereinander geschaltete Fragmente jeweils der Größe 36 000 Daltons, liegt die Vermutung nahe, daß das fehlende Proteinfragment für diese Inaktivierung verantwortlich ist. Ein Proteinfragment der Größe 10 bis 12 000 Daltons oder Bruchstücke davon, wie

gefordert werden müßte, konnten jedoch in keinem Falle gefunden werden. Das hypothetische Fragment könnte möglicherweise einem sofortigen vollständigen Abbau unterliegen. Da es schließlich auch möglich war, Enzympräparationen zu finden, die in ihre Einzelkomponenten zerfallen waren, jedoch unverändert aktive Teilaktivitäten besaßen, die ferner, außer der bekannten Transacetylasespaltung in der Länge der Polypeptidkette keinen Unterschied zeigten, liegt die Vermutung nahe, diesem hypothetischen Peptidfragment die komplexbildende Eigenschaft zuzubilligen. Die Versuche mit exogenen Proteasen, insbesondere mit dem Thermolysin weisen auch in diese Richtung, obwohl es auch hier nicht möglich war, das hypothetische Peptidfragment zu isolieren. Diese Versuche legen auch nahe, daß zwischen den beiden, möglicherweise identischen, Transacetylase-Fragmenten der Größe 36 000 Daltons als Brücke eine längere Peptidregion vorhanden ist, die für die enzymatische Aktivität der Transacetylase nicht notwendig ist, da Proteasen verschiedener Spezifität immer die gleichen Spaltprodukte ergeben.

Nach den vorliegenden Versuchen kann angenommen werden, daß die Desaktivierung des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes ein Mehrschrittprozeß ist, bei dem zunächst eine Spaltung der Transacetylase stattfindet, ohne daß die enzymatische Gesamtaktivität oder die Struktur des Komplexes dadurch beeinträchtigt wird. In einem zweiten Schritt verliert dann der Komplex seine katalytische Aktivität, jedoch unter Erhaltung seiner Struktur. Dies mag durch einen vollständigen Zerfall dieses kleinen, hypothetischen Peptidfragmentes verursacht werden. Schließlich erfolgt, ebenfalls unter Erhalt der drei Teilaktivitäten, der Zerfall in die Untereinheiten, da das bindende Element nun vollständig zerstört ist. Es ist dabei interessant, zu beobachten, daß der Zerfall der Komplexstruktur nicht einhergeht mit dem Zerfall der Würfelstruktur der Transacetylase-Komponente. Dieses Enzym sollte daher, neben der Region, die für die Komplexbildung verantwortlich ist und die verschieden ist

vom katalytischen Zentrum dieses Enzyms, noch eine zusätzliche dritte Region besitzen, die für die Aggregation ihrer identischen Untereinheiten verantwortlich ist. Diese Region ist an eine der beiden großen proteolytischen Fragmente der Polypeptidkette der Transacetylase gebunden.

Die Transacetylase-Komponente des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes erweist sich damit als ein sehr gutes Beispiel dafür, daß bei Enzymen bestimmte Funktionen an räumlich genau festgelegte Regionen der Polypeptidkette gebunden sind. Strukturuntersuchungen an einer Reihe von verschiedenen Enzymen (82) bestätigen dieses Aufbauprinzip.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Der Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex aus Escherichia coli läßt sich reversibel in seine drei Einzelkomponenten zerlegen, die Pyruvat-Dehydrogenase, die Dihydroliponamid-Transacetylase und die Dihydroliponamid-Dehydrogenase. Die Spaltung erfolgt unter partiell denaturierenden Bedingungen, so daß die verschiedenen Komponenten gewisse Aktivitätseinbußen erfahren. Am Beispiel der Transacetylase-Komponente konnte in dieser Arbeit jedoch gezeigt werden, daß dadurch die Eigenschaften des Enzyms nicht wesentlich beeinträchtigt werden. Vergleichende Untersuchungen der isolierten mit der komplexgebundenen Komponente zeigen weitgehende Übereinstimmung im Verhalten der enzymatischen Aktivität gegenüber verschiedenen pH-Werten und Temperaturen, sowie gegenüber Veränderungen der Substratkonzentration. Dies ist auch ein Hinweis dafür, daß der Einbau dieses Enzyms in den Komplexverband seine Eigenschaften nicht wesentlich verändert. Die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der Transacetylase von der Konzentration des Dihydroliponamids zeigt bei beiden Enzympräparationen einen sigmoiden Verlauf, der

auf eine mögliche Wechselwirkung zwischen den Untereinheiten hinweist.

Reassoziationsversuche eines Partialkomplexes, bestehend aus Transacetylase und Dihydroliponamid-Dehydrogenase, mit der freien Pyruvat-Dehydrogenase-Komponente zeigen, daß die native Struktur des Komplexes praktisch vollständig wiederhergestellt wird. Das Fortschreiten der Reassoziation zeigt eine antikooperative Charakteristik, wenn man das Wiederauftreten der Gesamtaktivität des Komplexes als Maß für den Reassoziationsgrad nimmt. Ein gleichartiges Ergebnis ließ sich erhalten über die Methode der strahlungslosen Fluoreszenzenergieübertragung. Bei dieser Methode wurde zunächst pro Partialkomplexmolekül eine Untereinheit der Pyruvat-Dehydrogenase-Komponente, die mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluorescamin markiert war, gebunden. Die volle Absättigung des Komplexes erfolgte anschließend mit Pyruvat-Dehydrogenase-Untereinheiten, die mit dem Farbstoff Fluorescein gekoppelt waren. Zwischen diesen beiden Farbstoffen ist eine strahlungslose Fluoreszenzenergieübertragung dann möglich, wenn sie sich räumlich näher als 60 Å gegeneinander orientieren. Durch diese Methode läßt sich nun unterscheiden, in welchem Maße die Bindung an unmittelbar benachbarte, das heißt direkt aneinander stoßende Untereinheiten bevorzugt, oder auch benachteiligt wird gegen eine Bindung an isolierte Stellen auf dem Komplex. Man erhält so direkte Hinweise für kooperative Bindungsmechanismen. Auch nach dieser Methode zeigte sich ein antikooperatives Bindungsverhalten der Pyruvat-Dehydrogenase-Komponente an den Partialkomplex. Diese Antikooperativität mag ein Hinweis für sich zwischen nachbarschaftlichen Untereinheiten ausbildende Wechselwirkungen sein.

Spontane Proteolyse der Transacetylase-Komponente, die auch den Angriffsort für exogene Proteasen, wie Thermolysin, Trypsin, Chymotrypsin und Subtilisin darstellt, zeigten, daß das Vorhandensein der katalytischen Teilaktivitäten der

drei Enzymkomponenten, wie auch die intakte Struktur des Enzymkomplexes nicht hinreichen, die Gesamtaktivität zu katalysieren. Weiter konnte gezeigt werden, daß, selbst bei vollständiger Intaktheit der katalytischen Aktivitäten der Einzelkomponenten die Komplexstruktur zerfallen kann. Dabei läßt sich nur eine Spaltung der Transacetylase-Komponente in aktive Fragmente der Größe 36 000 Daltons beobachten. Ein bei dieser Spaltung verlorengegangenes Peptidbruchstück der Transacetylasekette scheint verantwortlich zu sein für die Ausbildung der nativen Komplexstruktur.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Reed, L. J. and Oliver, R. M. (1968) Brookhaven Symp. Biology 21, p. 397

2. Reed, L. J. (1974) Acc. Chem. Res. 7, p. 40

3. Bates, D. L., Danson, M. J., Hale, G., Hooper, E. A. and Perham, R. N. (1977) Nature, Vol. 268, p. 313

4. Gunsalus, I. C. (1954) Symposium on the Mechanism of Enzym Action (edited by W. D. Mc. Elroy and B. Glass) The Johns' Hopkins Press, Baltimore, p. 545

5. Koike, M., Reed, L. J. and Carall, W. R. (1960) J. Biol. Chem. 235, p. 1924

6. Vogel, O., Hoehn, B. and Henning, U. (1972) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, p.1615

7. Danson, M. J., Hale, G., Johnson, P. and Perham, R. N. (1979) J. Mol. Biol. 129, p. 603

8. Eley, M. H., Namihara, G., Hamilton, K., Munk, P. and Reed, L. J. (1972) Arch. Biochem. Biophys. 152, p. 655

9. Reed, L. J. (1975) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, p. 3088

10. Bates, D. L., Harrison, R. A. and Perham, R. N. (1975) FEBS Lett. 60, p. 427

11. Perham, R. N. and Hooper, E. A. (1977) FEBS Lett. 73, p. 137

12. Koike, M., Reed, L. J. and Caroll, W. R. (1963) J. Biol. Chem. 238, p.30

13. De Rosier, D. J. and Oliver, R. M. (1972) Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 36, p. 199

14. Nawa, H., Brady, W. T., Koike, M. and Reed, L. J. (1960) J. Am. Chem. Soc. 82, p. 896

15. Vogel, O. and Henning, U. (1971) Eur. J. Biochem. 18, p. 103

16. Henney, H. R., Willms, C. R., Muramatsu, T., Mukherjee, B. B. and Reed, L. J. (1967) J. Biol. Chem. 242, p. 898

17. Ambrose, M. C. and Perham, R. N. (1976) Biochem. J. 155, p. 429

18. Grande, H. J., Bresters, J. W., De Abren, R. A., De Kok, A. and Veeger, C. (1975) Eur. J. Biochem. 59, p. 355

19. Moe, O. A. and Hammes (1974) Biochemistry 13, p. 2547

20. Moe, O. A. and Hammes (1974) Biochemistry 13, p. 2552

21. Shepherd, G. and Hammes (1976) Biochemistry 15, p. 311

22. Shepherd, G. and Hammes (1977) Biochemistry, Vol. 16, p. 5234

23. Shepherd, G. and Hammes (1976) Biochemistry 15, p. 2888

24. Brown, J. P. and Perham, R. N. (1972) FEBS Lett. 26, p.221

25. Ambrose, M. C. (1978) Biochem. Soc. Transaction 225, 572 nd Meeting London

26. Brown, J. P. and Perham (1976) Biochem. J. 155, p. 419

27. Danson, M. J. and Perham (1976) Biochem. J. 159, p. 677

28. Collins, J. H. and Reed, L. J. (1977) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Vol. 74, No. 10, p. 4223

29. Frey, P. A., Ikeda, B. H., Gavino, G.R., Spechhard, D. C. and Wong, S. S. (1978) J. Bact. Chemistry, Vol. 253, No. 20, p. 7234

30. Henning, U., Dennert, G., Hertel, R. and Shipp (1966) Cold Spring Harborsymposium für quantitative Biologie 31, p. 227

31. Creaghan, I. T. and Guest, J. R. (1972) J. Gener. Microbiol. 71, p. 207

32. Guest, J. R. and Creaghan, I. T. (1973) J. Gener. Microbiol. 75, p. 197

33. Guest, J. R. (1974) J. Gener. Microbiol. 80, p. 523

34. Pettit, F. H. and Reed, L. J. (1967) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 58, p. 1126

35. Burleigh, B. C. jun. and Williams, C. H. jun. (1972) J. Biol. Chem. 247, p. 2077

36. Shen, L. C., Fall, L., Walton, G. M. and Atkinson (1968) Biochemistry 7, p. 4041

37. Shen, L. C. and Atkinson, D. E. (1970) J. Biol. Chem. 245, p. 5974

38. Schwartz, E. R., Old, L. O. and Reed, L. J. (1968) Biochem. Biophys. Res. Com. 31, p. 495

39. Schwartz, E. R. and Reed, L. J. (1968) Fed. Proc. 27, p. 389

40. Schwartz, E. R. and Reed, L. J. (1970) Biochemistry 9, p. 1434

41. Gebhardt, J. C. and Pardee, A. B. (1962) J. Biol. Chem. 237, p. 891

42. Murphy, T. A. and Wyatt, G. R. (1965) J. Biol. Chem. 240, p. 1500

43. Bisswanger, H. (1972) Dissertation, Fachbereich Chemie Tübingen

44. Stryew, L., Wu, C. (1972) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, p. 1104

45. Zukin, R. S., Hartig, P. R., Koshland, D. E. (1977) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74, p. 1932

46. Horrocks, W. D. jr., Holmquist, B. and Vallee, B. L. (1975) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, p. 4763

47. Ulman, E. F., Schwarzberg, M. and Rubenstein, K. E. (1976) J. Biol. Chem. Vol. 251, No. 14, p. 4172

48. Price, V. E. and Greenfield, R. E. (1954) J. Biol. Chem. 209, p. 363

49. Reed, L. J., Leach, F. R. and Koike, M. (1958) J. Biol. Chem. 232, p.132

50. Vogel, H. and Bonner, D. M. (1956) Microbiol. Genet. Bulletin 13, p. 43

51. Herbert, A. A. and Guest, J. R. (1970) J. Gener. Microbiol. 63, p. 151

52. Lennot, E. S. (1955) Virology 1, p. 190

53. Schwartz, E. R., Old, L. O. and Reed, L. J. (1968) Biochem. Biophys. Res. Com. 31, p. 495

54. Schwartz, E. R. and Reed, L. J. (1969) J. Biol. Chem. 244, p. 6074

55. Hager, L. P. and Gunsalus, T. C. (1953) J. Am. Chem. Soc. 75, p. 5767

56. Bergmeyer, H. U. (1970) Methoden der Enzymologie Analyse 440

57. Martin, R. G. and Ames, B. N. (1961) J. Biol. Chem. 236, p. 1372

58. Gornall, A. G., Bardawill, C. J. and David, M. M. (1949) J. Biol. Chem. 177, p. 751

59. Warburg, O. und Christian, W. (1941) Biochem. Zeitschrift 310, p. 384

60. Weber, K. and Osborn, M. (1969) J. Biol. Chem. 244, p. 4406

61. Yamamoto, K., Sekine, T. and Kanaoka (1977) Analyt. Biochemistry 19, p. 83

62. Wu, C. W., Yarbrough, L. R. and Wu, F. Y. (1976) Biochemistry Vol. 15, No. 13, p. 2863

63. Chen, R. F. (1968) Analytical Biochemistry 25, p. 412

64. Scouten, W. H., Lubcher, R. and Baughman (1974) Biochem. Biophys. Acta 336, p. 421

65. Harriman, P. D. (1972) Virology 48, p. 595

66. Ikeda, H. and Tomizawa, J. (1965) J. Mol. Biol. 14, p. 85

67. Inselburg, T. (1966) Virology 30, p. 27

68. Ozeki, H. and Ikeda, H. (1968) Ann. Rev. Genet. 2, p. 245

69. Harriman, P. D. (1971) Virology 45, p. 324

70. Arberg, W. (1960) Virology 11, p. 273

71. Choe, B. K. (1969) Mol. Gener. Genet. 105, p. 275

72. Vogel, O. (1969) Dissertation Tübingen

73. Stockell, A. (1959) J. Biol. Chem. 234, p. 1286

74. Wright, K. and Takahashi, M. (1977) Biochemistry 16, p. 1548

75. Durchschlag, H. (1975) Biophys. Struct. Mechanism 1, p. 169

76. Riggs, L. J., Seiwald, R. S., Burchhalter, J. H., Brown, C. M. and Metcals, P. G. (1958) Am. J. Pathol. 34, p. 1081

77. Udenfriend, S., Stein, S., Böhlen, P., Dairman, W., Leimgruber, W. and Weigele, M. (1972), Science 178, p. 871

78. Bisswanger, H., Manuskript in Vorbereitung

79. Hammersley, J. M. and Handscomb, D. C. (1965), Monte-Carlo-Methods, Methuen London

80. Gebhardt, C., Mecke, D. and Bisswanger, H. (1978) Biochem, Biophys. Res. Com. 84, p. 508

81. Perham, R. N. and Thomas, J. O. (1971) FEBS Lett. 15, p. 8

82. Henderson, R., Capaldi, R. A., Leigh, J. S. (1977) J. Mol. Biol. 112, p. 631

Lebenslauf

Am 10. April 1948 wurde ich in Al-Falojeh geboren. In Hebron besuchte ich die Volks- und Mittelschule bis meine Eltern 1963 nach Amman zogen, wo ich meine Reifeprüfung 1965 an dem Hussein-Kollege ablegte.

Im Wintersemester 1968 begann ich mit dem Biologie-Studium an der Universität Tübingen, wo ich am 17. September 1975 das Diplom in Biologie absolvierte.

Vom Oktober 1976 bis Februar 1980 arbeitete ich an der vorliegenden Dissertation am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen unter der Leitung von Herrn Professor Dr. D. Mecke.

Meine akademischen Lehrer waren die folgenden Herren Professoren:

B. Schwemmle, H. Zähner, Zetsche, W. Seyffert, F. P. Möhres, E. Müller, H. Krüger, K. Grell, K. Mägdefrau, W. Rüdorff, W. Schweizer, H. Metzner, A. Rieker, G. Weitzel.